

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E EN
SISTEMAS HETERÓLOGOS: CARACTERIZACIÓN Y
APLICACIONES**

TESIS DOCTORAL

NEREIDA JIMÉNEZ DE OYA

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E EN
SISTEMAS HETERÓLOGOS: CARACTERIZACIÓN Y
APLICACIONES**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por
Nereida Jiménez de Oya
para optar al grado de
Doctora en Ciencias
Madrid, 2010

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el laboratorio de “Zoonosis y Virología Medioambiental” del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Sáiz Calahorra y la co-dirección de la Dra. Estela Escribano Romero, merced a una beca predoctoral del INIA, asociada al proyecto, AGL2004-06071, financiado por el INIA.

Madrid, 26 de Mayo de 2010

Dña. Nereida Jiménez de Oya ha realizado su tesis doctoral bajo mi dirección en el laboratorio de “Zoonosis y Virología Medioambiental” del Departamento de Biotecnología del INIA (Madrid) adscrita al programa de doctorado de Virología del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. El tema de su tesis ha consistido en la clonación expresión y caracterización de proteínas recombinantes del virus de la hepatitis E en diferentes sistemas víricos heterólogos de expresión (baculovirus y virus vaccinia) y su posterior utilización como antígenos diagnósticos y como inmunógenos capaces de originar una respuesta específica en modelos animales de experimentación. Los resultados obtenidos durante la tesis han sido sumamente relevantes en el campo, habiendo podido caracterizar algunos de los procesos de glicosilación de las proteínas recombinantes, así como su localización celular en células de mamífero infectadas con virus recombinantes. Por otro lado, las proteínas generadas se han utilizado para la puesta a punto, optimización y validación de sistemas de diagnóstico (ELISA), los cuales presentan una muy buena especificidad y sensibilidad y son capaces de detectar la presencia de anticuerpos específicos frente al VHE tanto en sueros humanos, como porcinos. Con los ELISA desarrollados se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la prevalencia de anticuerpos específicos en la cabaña porcina española mediante el análisis de más de 1.400 sueros. Además, las proteínas recombinantes generadas son capaces de originar una respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con ellas. Por otro lado, se ha demostrado que las hembras preñadas inmunizadas son capaces de transferir los anticuerpos específicos a su descendencia tanto por vía intrauterina, como a través de la leche. Finalmente, las proteínas generadas se han empleado para la obtención y caracterización parcial de anticuerpos monoclonales murinos.

Su trabajo ha abierto diversas líneas de investigación que serán continuadas en el futuro por nuestro grupo de investigación. Además, ha contribuido muy significativamente a la obtención de diversas herramientas y reactivos de laboratorio de los que se carecía y que permitirán continuar con las investigaciones en marcha en unas mejores condiciones.

Durante su tesis, Nereida Jiménez de Oya ha mostrado una gran madurez y capacidad de trabajo, así como una magnífica actitud para interaccionar con el resto de los miembros del grupo. El trabajo desarrollado por ella ha contribuido de modo muy significativo al desarrollo de los proyectos de investigación en marcha. Durante el desarrollo de su tesis, Nereida Jiménez de Oya ha adquirido conocimientos en muy diversas técnicas y metodologías de virología, biología molecular e inmunología, así como en la manipulación de animales de experimentación y la obtención de órganos y fluidos de los mismos.



MINISTERIO
DE CIENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y
ALIMENTARIA (INIA)

DPTO. BIOTECNOLOGÍA

Los datos obtenidos como consecuencia de su contribución a las líneas de investigación en curso en el laboratorio han dado lugar a diversas publicaciones (Jiménez de Oya et al., Gastroenterol & Hepatol, 2007; Jiménez de Oya et al., J. Clin. Microbiol., 2009; Jiménez de Oya et al., Food & Environm. Virol., 2009; Lupulovic et al., Food & Environm. Virol., 2010; Alonso-Padilla et al., J. Virol. Method., 2010), así como a varias comunicaciones a congresos.

Por todo ello, consideramos que Nereida Jiménez de Oya ha desarrollado una excelente labor investigadora que le ha permitido obtener una muy buena formación en investigación, la cual contribuirá al desarrollo de su futura carrera investigadora.

Dr. Juan Carlos Sáiz
Investigador
Departamento de Biotecnología,
INIA. Madrid

Dra. Estela Escribano Romero
Titulada Superior
Departamento de Biotecnología,
INIA. Madrid

CORREO ELECTRÓNICO:

jcsaiz@inia.es
eescribano@inia.es

Ctra. de La Coruña, Km. 7,5
28040 MADRID
TEL: 91 347 14 97
FAX: 91 357 22 93

Bestia alquilada, va a donde lo llevan, carga cuanto le pongan encima, todos los viajes son iguales para él, pero ojala todos los de su vida fuesen como éste que la mayor parte del camino vino sin carga, con lirios en las orejas, algún día había de ser la primavera de los burros. **Memorial del Convento, José Saramago.**

A mí abuelo Ricardo

En primer lugar quiero agradecer al INIA la oportunidad brindada para el desarrollo de esta tesis.

A mi director de tesis, el doctor Juan Carlos Sáiz Calahorra, especialmente por haberme enseñado a ser más positiva, no sólo en el trabajo sino también en el terreno personal. A lo largo de estos años no has dejado de admirarme como jefe y aún más como persona. Muchísimas gracias!

A mi co-directora de tesis, la doctora Estela Escribano Romero, a la que aprecio más como compañera y amiga. Gracias por haberme enseñado tantísimas técnicas de laboratorio y por la paciencia que has tenido con mis mil: Estela, cómo hago..... En este último año me has demostrado un apoyo enorme en el laboratorio y fuera de él.

A mi pequeña, Laurita! Gracias a tí encontré este laboratorio y contigo empecé a dar mis primeros pasos. Pero especialmente te agradezco la amistad, atención y cariño que me has demostrado siempre. Desde el principio te has convertido en una parte muy importante de mi vida. La fortaleza que has derrochado siempre, aunque te parezca mentira, me ha ayudado mucho a lo largo de esta tesis, incluso en este último año, aunque hayamos estado tan alejadas. Te quiero recuca!

A Ana, que es una de las personas más sorprendentes que conozco, siempre con un buen gesto, una sonrisa, un abrazo. Que habría sido de mí sin tu ayuda con los ratoncitos (y de ellos!, pobrecitos), si no hubieras compartido conmigo los marrones de las malditas PCR de nuestra querida-odiada hepatitis y tantísimos momentos dentro y fuera del laboratorio. Eres una persona muy especial para mí y me encantaría seguir trabajando y saliendo a tomar copitas contigo en el futuro.

A Julius, mi compañero de bucle. Hemos ido parejos en esto hasta casi el último momento y ha sido un gustazo tenerte de compañero. Hemos compartido muchísimas experimentos, conversaciones, momentos, menos las duchas del CISA.....por poco! Espero que te vayan fenomenalmente las cosas porque tienes un valor enorme como investigador y como persona.

A Miguel, el semid... Es increíble que cuando llegaste ya estaba escribiendo la tesis y lo que me has ayudado en tan poco tiempo, con las inmunos, la escritura, los odiosos saltos de sección...Eres increíble y no sólo por la inteligencia que tienes (la cual alabamos a diario) sino por lo majete que eres. Te considero un compañero de laboratorio imprescindible y de juergas.... y pienso ir a pedirte trabajo porque sé que llegarás lejos.

A mi preciosa Inma, que me enseñó todo sobre el mundo de los baculovirus, los WB y tantísimas otras técnicas. Por ponerme los pies en la tierra en tantas ocasiones

con este mundo de la “ciencia”. Pero especialmente por ser tan cariñosa conmigo, por valorarme y por habérmelo hecho pasar pipa cuando empezamos a currar juntas y sobre todo ahora en las comidas. Eres un amor y espero que me cuentes tu secreto para conservarte tan bien, físicamente y con ese espíritu que tienes.

A Mary, por estar siempre tan disponible para resolverme las dudas y explicarme las cosas con tanta paciencia. Por haberme cedido el plásmido de vaccinia, imprescindible para llevar a cabo la última parte de este trabajo. El entusiasmo y dedicación que muestras en el trabajo es contagioso. Pero sobre todo he disfrutado con nuestra disparidad de criterios y conversaciones, espero seguir disfrutando de ellas y de tí que eres un amor.

A Janín, por los protocolos, las explicaciones dadas, las células prestadas y especialmente por su interés por mis cosas y mi estado, sobre todo en este último año. Me hubiera gustado poder pasar más tiempo contigo a la hora de la comida porque eres una persona muy dulce.

Y como mención común, a las vacas sagradas por ser como soís. Espero que algún día se reconozca el valor que tenéis en los laboratorios y que se os recompense por ello como os merecéis.

Al doctor José-Ángel Martínez Escribano por todos los reactivos, materiales, virus y técnicas cedidas y a los chi@s de su laboratorio. A Javier, Benoît y Edu por las miles de veces que nos habéis pasado células de insecto. Y especialmente a Carmen y Silvia, por toda la ayuda brindada para intentar solucionar los problemas con las purificaciones de proteínas y mejorar su rendimiento, pero sobre todo por ser tan simpáticas y estar disponibles para mí aún cuando andabais hasta arriba de trabajo. Soís un encanto.

Al laboratorio de la doctora Covadonga Alonso, por la paciencia de los primeros comienzos con las invasiones sufridas. A Pepe y Bruno, por la ayuda prestada con dudas, protocolos y manejos de aparatos al principio y por hacerme tan ameno los largos experimentos en el Z. A Miguel Ángel, por haberme ayudado con el microscopio confocal con tanta paciencia, pero sobre todo por los buenos ratos que me has hecho pasar en la cafetería, en poco tiempo te has convertido en una persona muy especial para mí, erizín!!!!. A Marta por ser tan alta, (que es broma); por ser tan maja! Y a Bárbara, por ser tan cariñosa conmigo.

Al doctor Rafael Blasco por la cantidad de reactivos, protocolos y material cedido y por aguantar mis dudas sobre la localización de mis proteínas. A mí Paulita, por ayudarme con “la invasión de las levaduras”, darme ánimos siempre y ser tan cariñosa conmigo, eres mi oliva preferida. A Mikel, por tantas tardes de conversaciones

científicas, protocolos y material cedido y por las salidas nocturnas. Y las chicas de su laboratorio, Carolina y Maite por ser tan simpáticas y cariñosas.

Al laboratorio de inmunología, a sus jefes, por dejarnos usar las cabinas, aparatos y poyatas siempre que las hemos necesitado. A todas las niñas, que habéis sido un montón, Ana, Belén, Maite, Sara, Silvina, Paloma y especialmente a Conchí, por la ayuda prestada con las linfoproliferaciones y a Teresa, por compartir neuras en este último año. Durante el desarrollo de esta tesis una compañera fue víctima de la violencia machista; **NI UNA AGRESIÓN MACHISTA MÁS!**

Al laboratorio de Julio Coll, a Paloma y Sofía, que aunque nos hemos conocido hace poco me parecéis encantadoras. Y especialmente a Sandra, por haber compartido tantos ratos de cotilleos en el balcón y por los buenos momentos pasados fuera del INIA. Eres una tía genial a la que es difícil no cogerle cariño enseguida.

Al “laboratorio” de Gustavo del Real, a todas sus chicas, Carmen, María y especialmente a Charí, por echarme una mano con la estadística y a mi pequeña Chinchilla por ser tan cariñosa y escribirme post-it tan divertidos que, por cierto, me estás agudizando el síndrome de Diógenes! Y a mi M^a Ángeles, por echarme una mano en los duros comienzos en el CISA, fuiste de gran ayuda para mí.

A Margarita, porque eres un encanto de persona y nos cuidas siempre, preparándonos todo lo que necesitamos y más. Por tenernos tan presentes y traernos tantas cosas ricas y útiles, pero sobre todo por tener ese carácter que tienes y haber traído un soplo de brisa fresca al departamento.

A mis secres favoritas, la rubia (Vicky) y la morena (Mercedes), porque habéis sido un encanto y nos habéis hecho pasar momentos muy divertidos. Mercedes, esta gente no tiene ni idea de lo que se pierde!

A la doctora María Teresa Pérez-Gracia, que gentilmente nos cedió la muestra de heces porcinas infectadas con el VHE, que ha sido indispensable para la realización de esta tesis.

A la empresa ALGENEX por todas las larvas pinchadas a lo largo de esta tesis, especialmente a Ismael y a Rodrigo, que han sido las manos ejecutoras.

A la gente del CISA, especialmente al laboratorio de Belén Borrego, a Paco, Nuria y Lourdes, por hacer posible la producción de los anticuerpos monoclonales y por hacer tan sencillo y agradable trabajar con vosotros.

To Erwin Duizer doctor, for making possible to enjoy a stay abroad, for his hospitality and for having been so friendly with me.

A Justo, principalmente por tu amistad y por el apoyo a lo largo de esta tesis y por haberte tragado más de un ensayo de presentaciones a congresos.

A Miguel, porque eres una persona maravillosa y espero seguir disfrutando contigo, los cines, las cenas, la playa, la parcelita.

A Kiko, porque aunque nos hemos encontrado al final del camino, has puesto el punto justo de desparrame que necesitaba en estos momentos y por ser tan majete conmigo.

A mi familia política, Angelines, Honorato, Fernando y Mara por que sois encantadores, he tenido mucha suerte de encontrarme con vosotros.

E incondicionalmente a mi familia, especialmente a los más cercanos, Ricardo, Conce, Manolo, Eva, Fran y Amanda, por haberme inculcado de forma natural gran parte del amor que tengo a la naturaleza y haberme culturizado en tantos aspectos, pero sobre todo por el interés y admiración que habéis mostrado siempre hacia mi trabajo, es un placer teneros cerca.

A mis perritos, cuba y chico, por vuestra compañía y la tranquilidad que me daís.

A mi Panzuki, porque has sido mi compañero a lo largo de este viaje, por tragarte todas mis historias, laborales y personales, por apoyarme siempre y aguantarme este último año todo el finde pegada al ordenador, pero más que nada por ser mi mejor amigo, te quiero gordito!

Y sobre todo a mis padres y a mi hermana, POR TODO. Porque sois increíbles, por darme confianza, tranquilidad y apoyo en todo lo que hago y por sentirlos orgullosos de mí y quererme siempre, estoy muy orgullosa de las personas que sois y os quiero con locura.

A	adenina
A₄₉₅	absorbancia a longitud de onda de 495 nm
AcMo	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ALT	alanina-aminotransferasa
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	nucleasa del ácido ribonucleico
Asn	aminoácido asparagina
AST	aspartato-aminotransferasa
BLV	<i>big liver and spleen disease virus</i>
BrEt	bromuro de etidio
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)
C	citosa
cm²	centímetro cuadrado
C-terminal	carboxilo terminal
d.p.i	días post-infección
d.p.p	días post-parto
DEPC	dietileno pirocarbonato
Dic	dicroico
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTP	deoxirribonucleótido trifosfato
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	inmunoensayo enzimático en fase sólida (del inglés <i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>)
FA	fosfatasa alcalina
FHF	fallo hepático fulminante
g	gramo
G	guanidina
GFP	proteína fluorescente verde (del inglés <i>green fluorescent protein</i>)
GGT	gamma-glutamyltransferasa
GPT	guanina fosforibosil-transferasa
h	hora
h.p.i	horas post-infección
His	histidina
HRP	peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
HSS	síndrome de hepatomegalia-esplenomegalia (del inglés <i>Hepatomegaly-Splenomegaly Syndrome</i>)
IgA	inmunoglobulina de tipo A
IgG	inmunoglobulina de tipo G
IgM	inmunoglobulina de tipo M
IPTG	isopropil β-D-1-thiogalactopiranosido
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kV	kilovoltio
l	litro

M	molaridad
mA	miliamperio
MDI	multiplicidad de infección
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normalidad
n	tamaño de muestra
ng	nanogramo
nm	nanómetro
nt	nucleótido
N-terminal	amino terminal
NTR	región no traducida (del inglés <i>non translated región</i>)
°C	grado centígrado
OPD	orto-fenil-dietanolamina
ORF	marco de lectura abierta (del inglés <i>open reading frame</i>)
p.i	post-infección
pb	pares de bases
PBS	tampón salino fosfato (del inglés <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	paraformaldehído
poli-A	poliadenilato
Pro	aminoácido prolina
r.p.m.	revoluciones por minuto
RE	retículo endoplasmático
RT-PCR	reacción de la transcriptasa inversa y PCR (del inglés, <i>reverse transcription-PCR</i>)
SFB	suero fetal bovino
SDS	dodecilsulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés <i>SDS – polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
seg	segundo
Ser	aminoácido serina
SFVr	replicón del virus del bosque de Semliki (del inglés <i>Semliki forest virus replicon</i>)
SRP	partícula de reconocimiento del péptido señal (del inglés <i>signal-recognition particle</i>)
T	timidina
Thr	aminoácido treonina
U	unidades
ufp	unidades formadoras de placa
V	voltios
VHA	virus de la hepatitis A
VHE	virus de la hepatitis E
VLP	partícula de tipo viral (del inglés <i>viral like particle</i>)
WB	<i>Western Blot</i>
WGA	aglutinina del germen de trigo (del inglés <i>wheat germ agglutinin</i>)
WR	aislado Western Reserve del virus vaccinia
X-gal	bromo-cloro-indolyl-galactopiranosido
μFD	microfaraday

µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro

SUMMARY

Hepatitis E, an enteric transmitted disease caused by hepatitis E virus (HEV), is responsible for large epidemics and sporadic outbreaks in endemic regions with low levels of hygiene and inadequate water supplies. Lately, the number of reported human autochthonous cases has increased in industrialized countries and a widespread distribution of the infection in the European swine population has also been suggested. HEV swine and human strains are genetically very similar which has raised the hypothesis of a zoonotic potential for the virus. This fact has been further confirmed after viral detection on pig's livers sold in local markets in Europe and U.S. and the description of humans cases after consumption of contaminated uncooked pork and deer meat. All these data highlight the need for better surveillance of viral activity in human and animal populations and, consequently, for more accurate specific tools to address it.

In this work, different recombinant forms of the open reading frame 2 (ORF2) capsid protein of HEV have been expressed in the baculovirus and the vaccinia virus systems. Both proteins, the complete ORF2 and a truncated form of it lacking the first 111 amino acids of the N-terminal, were efficiently produced and further characterized in both expression systems. Microscopy experiments showed that, in mammalian cells infected with the recombinant vaccinia virus generated, the complete form could be observed in the cell surface, the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, while the truncated form was localized at the endoplasmic reticulum. Both proteins can be N-glycosylated, although the glycosylation pattern observed was different in the two heterologous systems used. The generated proteins were used to set up an ELISA test for detection of specific anti-HEV antibodies. Best results were obtained with the partially purified truncated form of ORF2 obtained upon infection of insect larvae. The developed ELISAs presented a good specificity and sensitivity both with human and porcine sera and were further validated using a commercial kit. Once optimized, the ELISA was used, in combination with HEV-RNA detection by RT-PCR, to analyze the seroprevalence of HEV in over 1400 swine serum samples from different farms and regions across Spain. The results showed a widespread of HEV infection in the country, 20,4% of the animals tested were IgG positive and 18% of them had HEV-RNA in blood. Over 80% of the farms analyzed had, at least, one anti-HEV IgG positive animal and in half of them the infection was active, at least one animal was HEV-RNA positive. Analysis of the immunogenic capability of the generated recombinant proteins demonstrated that all of them elicited specific antibodies on all immunized mice. Immunization was passively transferred to the offspring both by intrauterine and lactation routes, as shown by the presence of specific antibodies in newborns of immunized mothers. Immunogenicity of the proteins was further applied to the generation and characterization of murine monoclonal antibodies.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	3
2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE)	4
2.1. Clasificación taxonómica	4
2.2. Estructura y organización genómica.....	4
2.3. Replicación y ciclo viral.....	6
2.4. Variabilidad genómica	7
3. LA HEPATITIS E	8
3.1. Características clínicas.....	8
3.2. Tratamiento y vacunas	10
3.3. Epidemiología	12
3.4. Transmisión	14
3.5. Prevalencia de anticuerpos frente al VHE.....	16
3.6. Diagnóstico.....	17
3.6.1. Detección molecular	17
3.6.2. Detección serológica	18
4. CRUZANDO LA BARRERA DE ESPECIE	21
4.1. El VHE en cerdos domésticos	21
4.2. El VHE en otros animales	23
4.3. El VHE aviar	24
4.4. Zoonosis	24
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	33
1.1. Porcinas	33
1.2. Humanas.....	33
2. MANIPULACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	34
2.1. Extracción de ARN.....	34
2.2. Obtención y amplificación de los ADNc	34
2.3. Oligonucleótidos.....	37
2.4. Electroforesis de los ácidos nucleicos.....	39
2.5. Purificación de los ácidos nucleicos	40
3. CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS GÉNICOS	40
3.1. Vectores.....	40

3.2. Mutagénesis dirigida	42
3.3. Obtención de los plásmidos recombinantes	42
3.4. Transformación en bacterias	45
3.5. Purificación del ADN de los plásmidos	45
3.6. Ensayos con enzimas de restricción	46
4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	46
5. CÉLULAS	46
5.1. Líneas celulares	46
5.2. Medios de cultivo	47
6. VIRUS	48
6.1. Producción de virus recombinantes	48
6.1.1. Baculovirus	48
6.1.2. Virus vaccinia	50
6.2. Titulación de virus	52
6.3. Purificación de virus vaccinia	52
7. PROTEÍNAS	53
7.1. Obtención de proteínas recombinantes en células	53
a) Células de insecto	53
b) Células de mamífero	53
7.2. Obtención de proteínas recombinantes en larvas de insecto	54
7.3. Cinética de la expresión de las proteínas recombinantes en células de insecto	55
7.4. Purificación de proteínas recombinantes	55
7.5. Electroforesis de proteínas	55
7.6. Determinación de la concentración de proteínas	56
7.7. Ensayos de glicosilación de proteínas recombinantes	56
8. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	57
8.1. Transferencia y <i>Western-Blot</i> (WB)	57
8.2. Ensayo inmunoenzimático	58
a) ELISA indirecto	58
b) ELISA de competición	58
8.3. Inmunofluorescencia indirecta	59
9. MICROSCOPIA ÓPTICA	60
9.1. Microscopía de fluorescencia convencional	60

9.2. Microscopía de fluorescencia confocal.....	60
10. EXPERIMENTOS IN VIVO	61
10.1. Ensayos de inmunización en el modelo murino	61
10.2 Estudio de la transmisión intrauterina y por lactancia de los anticuerpos desarrollados	61
11. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	62
11.1. Análisis del isotipo de los anticuerpos monoclonales	62
11.2. Purificación de los anticuerpos monoclonales	62
11.3. Marcaje con biotina de los anticuerpos monoclonales	63
11.4. Marcaje con Alexa Fluor-488 de los anticuerpos monoclonales.....	63
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	63
RESULTADOS	65
1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA (ORF2) DEL VHE EN SISTEMAS HETERÓLOGOS	67
1.1. El sistema de baculovirus.....	67
1.1.1. Obtención de los baculovirus recombinantes Bac-ORF2 y Bac- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2	67
1.1.2. Expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células de insecto.....	68
1.1.3. Estudio de la cinética de expresión de las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células de insecto.....	70
a) ORF2r	70
b) $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r.....	71
1.1.4. Estudio de la glicosilación de las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en células de insecto.....	72
1.1.5. Expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en larvas de insecto	73
1.1.6. Purificación de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r producidas en larvas de insecto	74
1.2. El sistema de vaccinia	77
1.2.1. Obtención de los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2.....	77

1.2.2. Expresión de las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv en células de mamífero	77
1.2.3. Estudio de la glicosilación de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv en células de mamífero	79
1.2.4. Estudio de la localización celular de las proteínas recombinantes en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes...	80
2. ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL VHE: DESARROLLO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO	86
2.1. El sistema de baculovirus	86
2.1.1. Proteínas expresadas en células de insecto	86
2.1.1.1. <u>Optimización de la dilución de antígeno con sueros humanos y porcinos</u>	86
2.1.1.2. <u>Optimización de la dilución de los sueros humanos y porcinos con ambos antígenos</u>	87
2.1.1.3. <u>Criterio para el establecimiento del valor umbral</u>	88
2.1.1.4. <u>Comparación de la reactividad de los antígenos recombinantes en ELISA</u>	89
2.1.2. Proteínas parcialmente purificadas de larvas de insecto.....	90
2.1.2.1. <u>Optimización de la concentración de antígeno con sueros humanos y porcinos</u>	90
2.1.2.2. <u>Optimización de la dilución de sueros humanos y porcinos</u>	91
2.1.2.3. <u>Criterio para el establecimiento del valor umbral</u>	92
2.1.2.4. <u>Comparación de la reactividad de los antígenos recombinantes en ELISA</u>	92
2.2. El sistema de vaccinia	92
2.2.1. Proteínas expresadas en células de mamífero	92
2.2.1.1. <u>Optimización de la dilución de antígeno y suero</u>	93
2.2.1.2. <u>Criterio para el establecimiento del valor umbral</u>	94
2.2.1.3. <u>Comparación de antígenos recombinantes en ELISA</u>	94
3. VALIDACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ELISA DESARROLLADO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARCIALMENTE PURIFICADAS DE LARVAS DE INSECTO.....	95

4. DETECCIÓN DEL ARN DEL VHE Y ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS IgG ANTI-VHE EN LA CABAÑA PORCINA ESPAÑOLA	98
4.1. Herramientas de detección de anticuerpos y ARN del VHE	98
4.2. Detección serológica de anticuerpos frente al VHE	99
4.3. Distribución de IgG anti-VHE en relación a la edad de los animales	101
4.4. Estudio de la relación entre la presencia de ARN del VHE y de IgG anti-VHE en la cabaña porcina	101
4.4.1. Prevalencia de ARN del VHE	101
4.4.2. Prevalencia de IgG anti-VHE	102
4.5. Análisis filogenético del VHE	104
5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS Y VIRUS RECOMBINANTES EN EL MODELO MURINO	105
5.1. Inmunización con proteínas recombinantes generadas en el sistema de baculovirus	105
5.2. Inmunización con los virus vaccinia recombinantes	109
5.3. Estudio de las rutas de transmisión de anticuerpos específicos de madres inmunizadas a sus crías	111
6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	116
DISCUSIÓN	125
1. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA (ORF2) DEL VHE	127
a) El sistema de baculovirus	128
<u>Células de insecto Sf21</u>	128
<u>Larvas de insecto (<i>Trichoplusia ni</i>)</u>	129
b) El sistema de vaccinia	130
1.1. Estudio comparativo de los patrones de glicosilación de las proteínas recombinantes del VHE expresadas en el sistema de baculovirus o en el del virus vaccinia	131
1.2. Estudio de la localización celular de las proteínas recombinantes en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes	133
2. DESARROLLO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO BASADOS	

EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GENERADAS	135
3. VALIDACIÓN DEL ELISA DESARROLLADO CON PROTEÍNAS PARCIALMENTE PURIFICADAS DE LARVAS DE INSECTO	138
4. DETECCIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DEL VHE EN LA CABAÑA PORCINA ESPAÑOLA	139
a) Detección serológica	139
b) Detección molecular	140
c) Prevalencia de ARN e IgG anti-VHE	141
5. ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL MODELO MURINO	143
5.1. Producción de anticuerpos específicos	143
5.2. Estudio de las rutas de transmisión vertical de la inmunidad adquirida	144
6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	145
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXO I.....	169
ANEXO II.....	175

INTRODUCCIÓN

La hepatitis E es una enfermedad de transmisión entérica originalmente detectada en regiones tropicales y subtropicales con malas condiciones sanitarias e inadecuadas fuentes de agua potable, en donde es considerada endémica. Hasta hace poco, la mayoría de los casos detectados en regiones industrializadas se relacionaban con las llamadas “enfermedades del viajero”, pero en los últimos años cada vez se describen más casos de origen autóctono. El agente causal es el virus de la hepatitis E (VHE). Su presencia en animales domésticos y silvestres, especialmente en cerdos, y la elevada similitud genética de los aislados de estos animales con las cepas humanas de una misma región geográfica, han puesto de manifiesto la posible transmisibilidad del VHE entre diferentes especies animales y por tanto, la posibilidad de que la hepatitis E sea una zoonosis.

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1957 Viswanathan y colaboradores (239) documentaron una epidemia de hepatitis que afectó a unas 29.000 personas en Delhi entre los años 1955 y 1956 y que al parecer tuvo lugar por una contaminación fecal del agua. Otra epidemia similar tuvo lugar en el valle de Kashmir en 1979. Estudios serológicos llevados a cabo en 1980 por Khuroo y colaboradores (115) utilizando muestras congeladas de estas dos epidemias ocurridas en la India, pusieron de manifiesto la existencia de un agente viral de transmisión entérica responsable de producir una hepatitis distinta a la hepatitis A, que fue originalmente denominada hepatitis de tipo no-A, no-B y que con posterioridad pasó a denominarse hepatitis E.

El agente causal de la hepatitis E fue descrito por primera vez por Balayan y colaboradores en 1983 (15) gracias a la participación de un voluntario que ingirió una preparación obtenida de pacientes con hepatitis diagnosticadas como de tipo no-A, no-B. El voluntario desarrolló una hepatitis aguda, sin presentar anticuerpos frente a hepatitis de tipo A ni B. Por microscopía electrónica se identificaron partículas de tipo viral (VLP, del inglés *viral like particles*) en sus heces y se observó una respuesta inmune humoral frente a estas partículas. Además se consiguió reproducir la infección en primates (*Macacus cynomolgus*) tras su inoculación con las partículas virales aisladas del voluntario.

En 1990 Reyes y colaboradores (190) consiguieron aislar y secuenciar parcialmente el genoma del virus, si bien no fue hasta un año después en que Tam y colaboradores (221)

lograron la secuencia genómica completa del mismo. El agente etiológico fue denominado con posterioridad como virus de la hepatitis E, VHE (124).

2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE)

2.1 Clasificación taxonómica

Tras la detección original del virus por microscopía electrónica (15) se estableció, mediante análisis de hibridación (190), que se trataba de un virus ARN al que inicialmente se clasificó erróneamente dentro de la familia *Picornaviridae* (15). Posteriormente y hasta 1998 basándose en similitudes morfológicas, estructurales y fisicoquímicas, el virus se clasificó como un género separado dentro de la familia *Caliciviridae* (190). Sin embargo análisis filogenéticos posteriores de regiones de la ARN helicasa y de la ARN polimerasa dependiente de ARN mostraron una mayor relación con el virus de la rubeola, familia *Togaviridae*, género *Alphavirus* y con un virus de plantas, el *Beet Necrotic Vein Virus*, familia *Togaviridae*, género *Furovirus* (67, 123) y se excluyó de la familia *Caliciviridae* (19), clasificándose en un género independiente denominado “*virus similares al de la Hepatitis E*” (183). Actualmente se incluye en la familia *Hepeviridae*, género *Hepevirus*, del que es el único representante (55).

2.2 Estructura y organización genómica

La partícula vírica del VHE es esférica y pequeña, de unos 27-34 nm de diámetro (15). El virión carece de envuelta, tiene simetría icosaédrica y presenta depresiones en la superficie similares a las de los calicivirus (4, 126, 226).

El genoma del virus está constituido por una única molécula de ARN de polaridad positiva de unos 7.200 nucleótidos (nt) de longitud que codifica tres marcos de lectura abierta superpuestos, ORF (del inglés, *open reading frame*) (190, 221).

En el extremo 5' se localiza una región de unos 27-35 nt que no se traduce a proteína, 5' NTR (del inglés *non-translated region*) (Figura 1), con una caperuza en su extremo (107). Las reacciones enzimáticas de catalización de la caperuza ocurren de manera diferente a lo descrito para células eucariotas recordando, sin embargo, a las que tienen lugar en la superfamilia de los virus tipo alfavirus (142, 248).

A continuación de la región 5'NTR se localiza el primer marco de lectura abierta, ORF1, que se extiende 5.079 nt hacia el extremo 3'. Este gen codifica una poliproteína de 1.963 aminoácidos que contiene las proteínas no estructurales del virus con actividad enzimática involucradas en los procesos de replicación viral, transcripción y procesamiento proteico (104, 123). De esta forma, desde el extremo N-terminal al C-terminal de la poliproteína se encuentran: una metil-transferasa (M), un dominio Y de función desconocida (Y), una cisteín-proteasa del tipo de la papaína (Pr), una región de elevada variabilidad rica en prolina (Hy, P), otro dominio de función desconocida llamado X (X), una helicasa (H) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (R) (Figura 1).

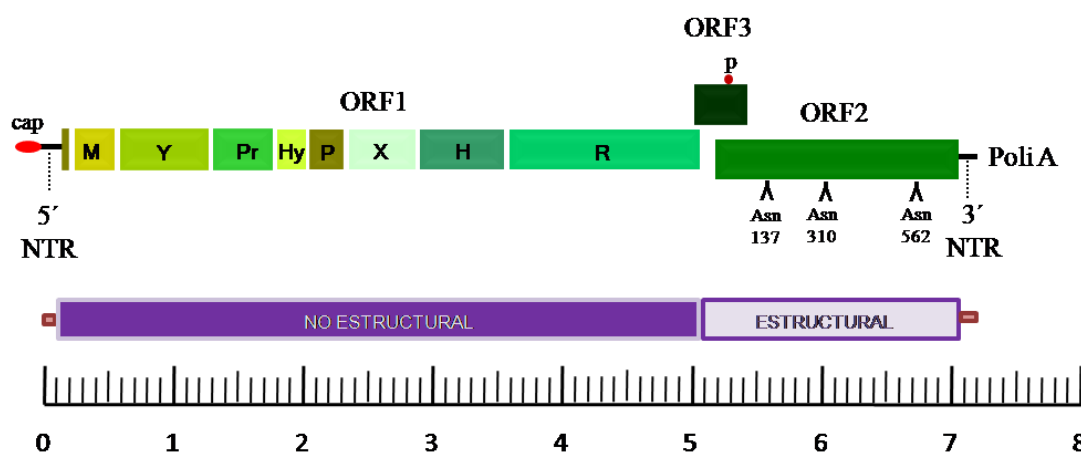


Figura1.: Representación esquemática de la organización genómica del VHE [Adaptado de referencias (40, 199, 248)].

A continuación se sitúa el ORF3, de 369 nt, que codifica la proteína más pequeña del virus, de 123 aminoácidos, con un tamaño estimado de unos 13,5 kDa (Figura 1). Se localiza justo en el extremo 3' de ORF1, solapando ambos genes en un nucleótido (221). Se trata de una proteína no glicosilada que está fosforilada en el aminoácido Serina-80 y que se asocia con el citoesqueleto hepatocelular (255) formando un complejo con la proteína de la cápsida del virus, ORF2 (235). Este hecho hace pensar que ORF3 puede servir como anclaje al citoesqueleto para el ensamblaje de las partículas virales, ya que en su extremo N-terminal posee una región rica en cisteínas capaz de unir ARN (104). También se postula que esta proteína pudiera tener funciones reguladoras implicadas en la modulación de la señalización celular (57). Esta hipótesis se sustenta en la existencia de un

dominio rico en prolina que se une a ciertos dominios SH3 (del inglés, *src-homology*) (15), presentes en algunas proteínas celulares (254) involucradas en señalización celular (57). La proteína ORF3 presenta también epítomos neutralizantes en su región 3' (221).

La siguiente región del genoma corresponde al ORF2, el cual se extiende a lo largo de 1.980 nt y solapa por su extremo N-terminal en 328 nt con ORF3 (Figura 1). ORF2 codifica la proteína principal de la cápsida viral, de unos 660 aminoácidos (221). Experimentos *in vitro* sugieren que ORF2 se sintetiza como un precursor glicoproteico de unos 88 kDa, que luego se procesa para dar lugar a la proteína madura. El precursor posee un posible péptido señal en su extremo N-terminal para su direccionamiento al retículo endoplasmático, donde sería procesado y tres sitios potenciales de glicosilación (104, 254), característica común en las proteínas de superficie de virus con envuelta, pero no en proteínas de la cápsida de virus que carecen de ella (248). Basándose en estos datos se ha sugerido que la proteína sufre una translocación a través del retículo endoplasmático y que se localiza tanto intracelularmente como en la superficie celular (248, 254). La proteína ORF2 es la más inmunogénica del virus, presentando epítomos que inducen anticuerpos neutralizantes localizados principalmente cerca del extremo carboxilo (221).

El genoma del virus termina en una región pequeña que no se traduce a proteína, 3' NTR, de unos 65 nt (Figura 1) y que se localiza justo antes de una cola de poli-A (221).

2.3 Replicación y ciclo viral

Dado que no existe un sistema eficaz de cultivo celular del virus actualmente se desconoce el ciclo biológico del mismo así como sus mecanismos de replicación. En cualquier caso, se postula que estos mecanismos son probablemente muy similares a los de otros virus ARN de polaridad positiva (189). Estas teorías se han visto reforzadas por la evidencia de la presencia de intermediarios de la replicación, como son las cadenas ARN de polaridad negativa, encontradas en hígados de monos *Rhesus* y de cerdos infectados experimentalmente (151, 162). Estos hallazgos sugieren fuertemente que el virus replica en células hepáticas. Sin embargo, y dado que también se ha detectado la cadena negativa de ARN del virus en tejidos y órganos distintos del hígado (143, 245), posiblemente exista también una replicación extra-hepática.

Recientemente se ha generado un clon infeccioso de VHE de genotipo III que se propaga con relativa eficiencia en cultivos celulares y que puede convertirse en una

herramienta fundamental para el conocimiento de los mecanismos de replicación del VHE (251).

2.4 Variabilidad genómica

El VHE se mantiene en general genómicamente estable. Los aislados virales de un mismo brote epidémico presentan una gran similitud en sus secuencias genómicas. Estudios realizados mediante el pase seriado del virus en animales no han mostrado variaciones en el genoma (13, 248). Sin embargo y a pesar de esta estabilidad genómica, también hay datos que apoyan la naturaleza de quasiespecies del VHE (74). Por otra parte, los aislados de diferentes zonas geográficas presentan algunas diferencias genómicas. Basándose en esta heterogeneidad, el VHE se clasifica dentro de cuatro genotipos diferentes, que se denominan: genotipos I, II, III y IV (140, 200, 202, 221, 243) (Figura 2).

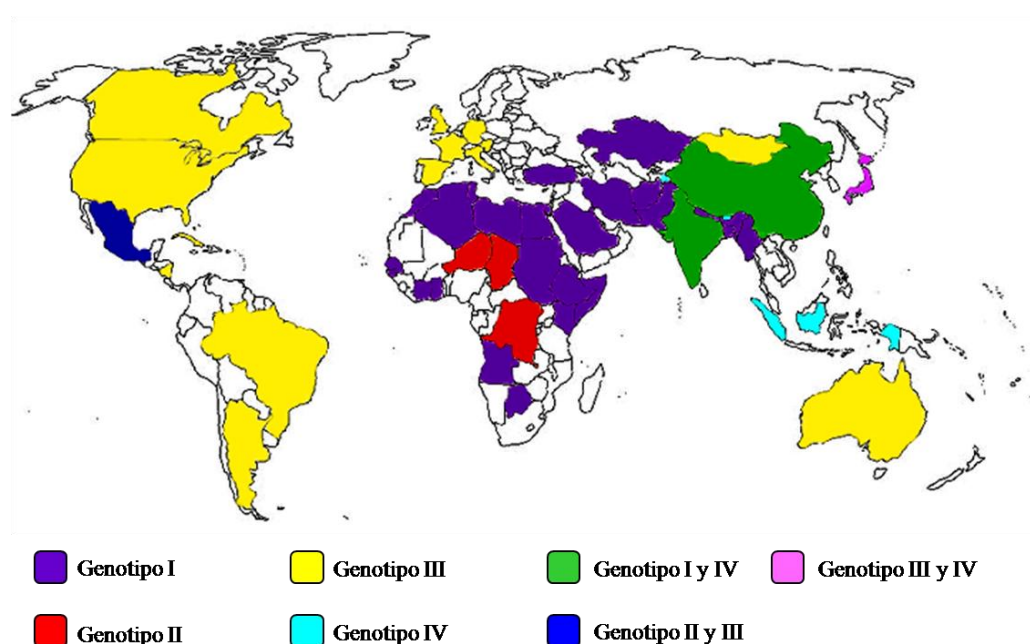


Figura2.: Representación de la distribución mundial de los diferentes genotipos del VHE [Adaptado de referencia (172)].

El genotipo I se distribuye principalmente en Asia y África. A este grupo corresponden aislados epidémicos de regiones en vías de desarrollo, en donde el virus se considera endémico, tales como el aislado de Birmania, Bur-82 (221), que es el prototipo del grupo. Este genotipo es el que presenta más similitud de secuencias entre cepas distintas y en la actualidad se clasifica en cinco subtipos: 1a-1e. (140).

El genotipo II es el grupo en el que existen menos secuencias descritas. Corresponde a aislados de México, Nigeria y Chad y en la actualidad se divide en dos subtipos, el 2a y el 2b (140).

El genotipo III agrupa cepas bastante diversas de regiones consideradas hasta hace poco tiempo como no endémicas. Son fundamentalmente cepas de E.E.U.U., Argentina, países europeos como España, Italia o Grecia, y países asiáticos, como China y Japón. En la actualidad se divide en diez subtipos, a saber, 3a-3j (140).

El genotipo IV agrupa cepas de Asia, principalmente de China, aunque también se han descrito en Taiwán, Japón, Vietnam, India e Indonesia. Actualmente se divide en siete subtipos: 4a-4g (140).

Hasta muy recientemente los genotipos I y II se habían detectado exclusivamente en humanos, a diferencia de los genotipos III y IV, que pertenecían a cepas de origen tanto humano como porcino; sin embargo, hace poco se ha descrito una cepa porcina en Camboya que pertenece al genotipo I (34).

A pesar de la relativa diversidad genómica de las diferentes cepas, en la actualidad se acepta generalmente la existencia de un único serotipo del VHE.

En 2001, Haqshenas y colaboradores (81) identificaron y caracterizaron genéticamente un nuevo virus relacionado con el VHE a partir de la bilis de gallinas que padecían el síndrome de hepatomegalia-esplenomegalia (HSS, del inglés, *hepatomegaly-splenomegaly syndrome*). Basándose en similitudes de organización genómica y de identidad de secuencias con el VHE detectado en humanos y cerdos, se le denomina VHE aviar y se le ha clasificado provisionalmente como un posible genotipo V.

3. LA HEPATITIS E

3.1 Características clínicas

La hepatitis E presenta unas características clínicas y epidemiológicas similares a las de la hepatitis A aguda. Tal y como se ha comentado anteriormente, el curso clínico de la infección se describió por primera vez en un voluntario humano que ingirió una preparación procedente de las deposiciones de 9 pacientes con hepatitis de tipo no-A, no-B

(15). El periodo medio de incubación es de unas 6 semanas, aunque puede variar de 2 a 10 semanas (15, 41, 124, 239).

Como en cualquier hepatitis, tras la infección se observa una variación de los niveles normales de las proteínas y enzimas hepáticas. Se detecta bilirrubinuria (presencia de bilirrubina en la orina), un incremento variable en el suero de la bilirrubina, un marcado incremento en sangre de la enzimas hepáticas, como la alanina-aminotransferasa (ALT), la aspartato-aminotransferasa (AST) y actividad de la gamma-glutamilttransferasa (GGT), y un incremento medio de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA). El incremento de las transaminasas no está proporcionalmente relacionado con la severidad del daño hepático y suele preceder a la aparición de los síntomas (4, 115, 264). Los valores enzimáticos retornan a la normalidad entre dos y seis semanas después de la infección (115).

La excreción de virus en las heces comienza aproximadamente una semana antes de la aparición de los síntomas y continúa durante más de 2 semanas (3, 41, 248). El ARN del virus se detecta también en suero y bilis a los pocos días de la infección llegando a detectarse en sangre hasta 40 días después del comienzo de los síntomas (216, 227) (Figura 3).

Las manifestaciones clínicas de la infección son variables, incluyendo hepatitis icterica, hepatitis severa con desarrollo de fallo hepático fulminante (FHF) y hepatitis no icterica, si bien en muchos casos la infección es asintomática (126).

La hepatitis aguda icterica se caracteriza por un pródromo de la enfermedad similar al de la gripe, con malestar general, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos. También puede observarse anorexia, artralgias, astenia, heces de color arcilloso, orina de color oscuro, diarrea, prurito, exantemas cutáneos e ictericia (115, 126, 239, 264). En algunos pacientes puede llegar a desarrollarse colestasis (126). La enfermedad normalmente se resuelve en un periodo de 1 a 4 semanas, pudiendo prolongarse en algunos casos hasta 6 meses sin que existan evidencias clínicas de que la enfermedad pueda llegar a ser crónica (247). Sin embargo cabe destacar que recientemente se han publicado algunos trabajos en los que se presentan evidencias bioquímicas, histológicas y genéticas de infección crónica por el VHE en pacientes trasplantados, como son la elevación persistente de las transaminasas, viremia persistente e inflamación progresiva y fibrosis hepática (40, 78, 108).

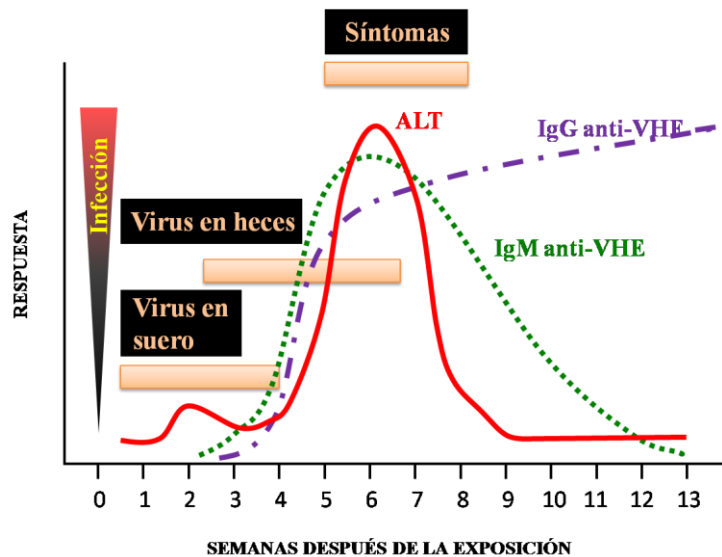


Figura 3.: Representación del curso clínico de la infección por el VHE (modificado de <http://www.cdc.gov>).

La tasa de mortalidad oscila entre el 0,2 y el 3%, aunque en mujeres embarazadas puede superar el 20% (39, 182). Esta tasa aumenta con el avance del embarazo pudiendo llegar a duplicarse durante el tercer trimestre de gestación (115, 117). La elevada mortandad en mujeres embarazadas se asocia a la elevada incidencia de fallo hepático fulminante (FHF), complicado con encefalopatía y coagulación intravascular diseminada. Se estima que el 60% de las mujeres embarazadas infectadas con el VHE desarrollan FHF (117, 209), y que la tasa de mortalidad temprana neonatal debida a aborto espontáneo es de alrededor del 33% (182).

En pacientes con enfermedades hepáticas crónicas la infección con el VHE puede desencadenar una descompensación hepática grave y originar encefalopatía hepática y fallo renal (128, 156). La tasa de mortalidad en estos pacientes puede llegar a ser del 70% (47).

3.2 Tratamiento y vacunas

En la actualidad no existe un tratamiento específico para la hepatitis E, ni se dispone de vacunas comerciales para la prevención de la infección con el VHE.

En modelos animales, primates no humanos, se ha logrado una inmunización pasiva a través de la administración de sueros de fase convaleciente (233); sin embargo, en humanos, los primeros estudios de administración de inmunoglobulinas obtenidas de habitantes de regiones endémicas para el VHE no tuvieron éxito (116). Cabe resaltar que

estos estudios se llevaron a cabo con plasma que no había sido previamente seleccionado, de forma que son necesarios más estudios para poder establecer el papel real de las inmunoglobulinas en la profilaxis de la enfermedad.

En cualquier caso, uno de los inconvenientes para el desarrollo de vacunas y fármacos específicos, es el hecho de que los únicos modelos válidos de experimentación animal son los primates no-humanos, principalmente macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) y *Rhesus* (*Macaca mulatta*) y, en menor medida, chimpancés (*Pan troglodites*) y tamarinos (*Saguinus mystax*) (61, 152, 172). Aunque la infección experimental también se ha conseguido reproducir en ratas de laboratorio (143) y se ha descrito la infección experimental de ratones desnudos que carecen de timo, es decir, con el sistema inmune deprimido (92), los ratones de uso habitual en experimentación no parecen ser susceptibles a la misma (133). Los cerdos son también susceptibles a la infección experimental con aislados humanos o porcinos (16), pero en ellos la enfermedad cursa de modo asintomático. Recientemente también se ha descrito la infección experimental de corderos con aislados humanos (236).

Como hasta la fecha no existe un sistema de cultivo productivo eficaz para el VHE, el desarrollo de vacunas basadas en virus vivo atenuado, o inactivado, no es viable. Por ello las posibles vacunas que se están desarrollando se basan en el uso de proteínas recombinantes o de ADN recombinante (82, 84, 109, 110).

Contrariamente a lo que ocurre con la proteína ORF2 los anticuerpos desarrollados contra ORF3 se encuentran principalmente en sueros de fase aguda de la infección con el VHE y son específicos de cepa (71, 249). Por este motivo, y dado que la mayoría de los epítomos inmunodominantes descritos se localizan en ORF2, es esta proteína la que se está utilizando para el desarrollo de vacunas con proteínas recombinantes (249).

La proteína ORF2 completa o péptidos de ella, se ha expresado en células bacterianas (99, 136, 185, 260), de insecto (148, 191, 259), de mamífero (104), de levaduras (228, 229) y de plantas (242, 263). En la mayoría de los casos, la vacunación en animales de experimentación con este tipo de proteínas recombinantes genera la producción de anticuerpos específicos, muchos de ellos de carácter neutralizante. Estos anticuerpos confieren protección frente a la infección con el VHE, mimetizando lo que ocurre con las infecciones naturales, en las que se induce la producción de anticuerpos que protegen frente a nuevas infecciones del virus (28).

La infección experimental de primates no humanos induce anticuerpos neutralizantes que protegen frente a sucesivas infecciones con virus homólogos y heterólogos (8, 9). Aunque se ha descrito que la vacunación puede ser efectiva frente al desafío con virus homólogos y heterólogos (232), la mayoría de las vacunas ensayadas sólo protegen contra infecciones con virus homólogos (110, 185). Sin embargo, en muchos casos, la vacunación inhibe el desarrollo de la enfermedad, es decir, no se observan signos clínicos ni histopatológicos aunque se produce replicación del virus puesto que, aún con títulos bajos, éste se excreta en las heces (99).

Los datos obtenidos hasta la fecha indican que los mejores candidatos vacunales son los inmunógenos desarrollados en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes (125, 134, 208). Así, se han llevado a cabo ensayos de inmunización con VLP obtenidas de forma espontánea tras la expresión de una forma truncada de la proteína ORF2 en un sistema de baculovirus recombinante. Estas VLP del VHE generan una respuesta inmune y protegen frente al desarrollo de la enfermedad. Además pueden ser administradas oralmente (134). En los últimos años se está ensayando en humanos una vacuna basada en una de estas formas truncadas de la proteína ORF2 expresada en células de insecto. Esta vacuna ha superado con éxito la segunda fase del ensayo de vacunación en un grupo de voluntarios humanos (soldados nepalíes) realizado durante un brote epidémico, dado que se obtuvieron protecciones del 95% (208). Queda por determinar la duración de la protección, la seguridad de su uso en mujeres embarazadas y niños y la relación coste-efectividad fundamentalmente en regiones en vías de desarrollo, que son las más susceptibles a padecer epidemias (125).

3.3 Epidemiología

La hepatitis E se asocia tanto con casos esporádicos como con brotes epidémicos.

La duración de las epidemias es variable, llegando incluso a prolongarse durante años. La mayoría de las epidemias de hepatitis E tienen su origen en la contaminación fecal del agua y, consecuentemente, de los alimentos; por esta razón, las regiones donde el VHE es endémico, con bajos índices de desarrollo e inadecuadas condiciones higiénicas, de potabilización de aguas destinadas al consumo humano, tratamiento de aguas residuales y de las destinadas a la irrigación de cultivos, son las más susceptibles de sufrir epidemias de hepatitis E. A estos factores hay que sumar el clima ya que, en muchas ocasiones, se ha observado una correlación entre las inundaciones producidas por las lluvias tropicales y la

aparición de epidemias, a lo que también contribuyen las épocas de sequía tan características de climas tropicales y subtropicales. De hecho, en épocas de sequía también se han documentado epidemias dado que la disminución del volumen del agua de los ríos también puede incrementar los riesgos de infección (38, 160) posiblemente por una mayor concentración de partículas infecciosas.

Como se ha comentado con anterioridad, el VHE se considera endémico en regiones de Asia, Oriente Medio, África y América central (57, 200, 201), donde se han descrito varias epidemias de hepatitis E. Una de las regiones con más casos acontecidos es la India. El primer brote documentado corresponde al ocurrido en Delhi entre los años 1955 y 1956, con 29.000 casos (239). Con posterioridad ocurrió otro en el valle de Khasmir, entre 1978 y 1979 (115), y otro en Kampur, en 1991, con 80.000 casos (100). China también sufre epidemias frecuentes. Hasta la fecha se han reportado once grandes brotes siendo el de mayor magnitud el que tuvo lugar entre 1986 y 1988, que originó más de 119.000 casos con 700 muertos. África es también una zona de alta incidencia. Así, en Somalia, se documentó una epidemia en 1988 a lo largo del río Shebeli que duró hasta 1989, y causó 11.413 casos de hepatitis icterica y 146 muertos (21, 158). Una de las más recientes tuvo lugar en Dafur (Sudán), en 2004, en un campamento de refugiados de guerra, con más de 2.600 casos (76). La última epidemia documentada tuvo lugar en el norte de Uganda a finales del 2007, con más de 8.000 afectados y 121 muertos (www.afrol.com/articles/30656).

Los brotes esporádicos también son frecuentes en áreas endémicas. Por ejemplo, se estima que en India, entre el 50% y el 60% de los casos esporádicos de hepatitis se deben a una infección por el VHE (210). Probablemente la mayoría de estos casos tengan también un origen en la contaminación fecal de aguas o alimentos.

En todos los casos, los genotipos responsables de los brotes epidémicos son el I y el II. Los genotipos III y IV también están presentes en regiones endémicas con bajos índices de desarrollo, pero en estas regiones solamente son responsables de brotes esporádicos y afectan fundamentalmente al ganado porcino.

Otra de las características epidemiológicas de la hepatitis E es su incidencia en forma de brote esporádico en regiones industrializadas donde tradicionalmente no se ha considerado endémica. Hasta hace poco tiempo estos casos, que tenían una incidencia muy baja, se asociaban con viajes a regiones donde el virus es endémico. Sin embargo entre

1986 y 1999 sólo se han documentado 161 casos que hayan podido tener un origen relacionado con un viaje a una zona endémica (181, 247). En la actualidad se acepta que la adquisición local del virus en regiones industrializadas es un hecho. En las últimas décadas los casos documentados de este tipo se han visto incrementados no tanto por una mayor incidencia del virus en regiones industrializadas, sino, probablemente, por un mayor conocimiento del mismo y, por tanto, una mayor disponibilidad de herramientas de detección del virus y diagnóstico de la enfermedad.

3.4 Transmisión

Como ya se ha comentado con anterioridad, la principal ruta de transmisión del virus es la fecal-oral, fundamentalmente a través del consumo de aguas y alimentos contaminados, por lo que la mayoría de las epidemias del VHE se asocian con la contaminación fecal de agua. Las condiciones más óptimas para su transmisión se dan cuando las aguas residuales entran en contacto con el agua potable, lo que es frecuente en épocas de fuertes lluvias que provocan inundaciones, tal y como ocurrió en la epidemia de Delhi en los años 50, donde las filtraciones de las tuberías pusieron en contacto el agua potable con suelos contaminados y aguas residuales (239). El hacinamiento de personas en condiciones higiénicas que no son las adecuadas, como suele ocurrir en campos de refugiados y suburbios urbanos, también incrementa los riesgos de epidemias al aumentar las posibilidades de contaminación fecal de las aguas de consumo.

Los tratamientos habituales de aguas residuales no siempre son efectivos. Por ejemplo, en Madrás (India), se seguía detectando ARN del VHE en el 80% de las aguas tratadas en las plantas de potabilización. En Pune (India) se llevó a cabo un análisis de detección de virus en las aguas residuales de una planta de potabilización en el que se observó una cantidad significativamente mayor de VHA que de VHE antes del tratamiento. Y, sin embargo, después del mismo, el VHA dejaba de detectarse mientras que la cantidad de ARN del VHE permanecía invariable (237, 248). En cualquier caso, hasta la fecha se desconoce la relación existente entre moléculas de RNA y capacidad infecciosa del virus.

Aunque se ha descrito la presencia de partículas virales y/o ARN del VHE en aguas de ciudades y de mataderos de ganado porcino de países industrializados, incluyendo España (36, 178, 179), en otros estudios realizados en Estados Unidos no se ha podido detectar la presencia del VHE ni en aguas destinadas al consumo humano ni en aguas superficiales recogidas de granjas de cerdos que estaban afectados por el VHE (112). De

modo que, a fecha de hoy, no se ha podido confirmar de manera concluyente que exista un riesgo significativo de infección a través de este tipo de aguas contaminadas en países industrializados. En cualquier caso, hay que destacar que la detección de virus en aguas es complicada debido, entre otros, al factor de dilución que presentan este tipo de muestras.

A diferencia de lo que ocurre con el VHA, la transmisión de persona a persona, incluso en periodos de epidemias, es muy baja, de alrededor del 1-2% (5, 115). Por el contrario, las tasas de transmisión vertical del VHE de madre a hijo por vía intrauterina y perinatales descritas, aunque muy variables, son bastante elevadas, entre el 30 y el 100% (119, 128). También se ha documentado infección nosocomial del VHE (192) así como el riesgo que representan las transfusiones de sangre (26, 37, 120, 147, 155, 157, 222, 241).

Otra posible fuente de infección con el VHE es la comida. Tanto la irrigación con aguas contaminadas como la falta de higiene en la preparación de la comida pueden llevar a la aparición de brotes de hepatitis E especialmente si los alimentos se consumen sin cocinar o si los manipuladores están infectados por el virus y no guardan las medidas higiénicas adecuadas. Aunque escasos, se han descrito casos de infección por el VHE tras el consumo de marisco contaminado (32) y tras la ingesta de hierbas medicinales chinas (102). De hecho, el virus se ha detectado en bivalvos (*Corbícula japónica*) en Japón (132), muy probablemente debido a la contaminación de las aguas circundantes. El riesgo que representa la ingesta de comida infectada sin cocinar se ha demostrado claramente en estudios realizados en Japón (131, 252), en los que la aparición de casos de hepatitis E aguda se ha asociado concluyentemente con el consumo de hígado de cerdo o carne de jabalí crudos. En uno de estos estudios se relacionó claramente el consumo de carne cruda de un ciervo infectado con varios casos de hepatitis E aguda en miembros de una misma familia (225). En este estudio se demostró que todos los miembros de la familia que habían consumido la carne infectada padecieron la infección, excepto un niño que había consumido una cantidad muy pequeña de carne, lo que apoya la hipótesis de que la infección del VHE es dependiente de dosis. Los análisis de las secuencias del ARN del VHE obtenidas de los pacientes y de la carne infectada conservada en el congelador demostraron una elevadísima similitud de las secuencias que, en la mayoría de los casos, alcanzó el 100% (225).

3.5 Prevalencia de anticuerpos frente al VHE

Los datos de prevalencia de anticuerpos en humanos son muy variables. Muy probablemente esta variabilidad se debe, entre otras razones, a la falta de estandarización entre los diversos estudios, así como al empleo de diferentes sistemas de diagnóstico en los mismos.

En regiones donde la hepatitis E es endémica, la prevalencia de anticuerpos descrita varía entre el 3-27%, aunque se han llegado a describir porcentajes de serología positiva de hasta el 60% (66). A diferencia de lo que ocurre con otros virus de transmisión entérica, como el VHA, en general, los porcentajes de serología positiva en niños son más bajos que los de la población adulta, rondando el 5%, e incrementándose en adultos jóvenes hasta el 10-40% (97, 98, 126). Las razones para estas discrepancias no están claras pero se ha propuesto que podrían deberse a que la inmunidad adquirida en infecciones sub-clínicas ocurridas durante la infancia desaparece con el tiempo (39), si bien también se han descrito prevalencias del 60% en niños menores de 5 años en la India (6, 126).

En áreas no endémicas, la presencia de anticuerpos en la población frente al VHE es, generalmente, relativamente elevada, rondando normalmente el 2-10%. Estas tasas son, en muchos casos, más elevadas incluso que las descritas para algunas áreas consideradas endémicas (2, 247).

La prevalencia de anticuerpos IgG específicos contra el VHE en donantes de sangre en regiones industrializadas no endémicas varía entre 1,1-2,2% (157), alcanzando el 7,2-24,5% en regiones endémicas (210). Sin embargo, cabe destacar que en ciertas regiones no endémicas, como Estados Unidos, se han descrito tasas de IgG específicas frente al VHE en donantes de sangre que varían entre 18% y el 21,3% (210). En relación a estos datos, hay que tener en cuenta que en ciertas regiones el incremento del porcentaje en la prevalencia de anticuerpos frente al VHE en donantes de sangre puede deberse al hecho de que muchas veces la donación es remunerada, lo que introduce un sesgo en la población analizada.

La posible existencia de una mayor prevalencia de serología positiva frente al VHE en pacientes de hemodiálisis en comparación con la población general, y el consecuente establecimiento de este grupo de la población como grupo de riesgo, es aún objeto de debate. Así, hay estudios que indican que, en regiones endémicas, existe una mayor prevalencia de anticuerpos en pacientes de hemodiálisis que en la población en general (14,

129), mientras que otros estudios exponen lo contrario (223). Una controversia similar existe en las regiones consideradas como no endémicas, con la existencia de estudios que apoyan la mayor prevalencia de anticuerpos frente al VHE en pacientes de hemodiálisis (46, 145, 211) y otros que afirman lo contrario (184, 214). En cualquier caso, la seroconversión de pacientes durante la hemodiálisis (155) ha puesto de manifiesto que el riesgo de transmisión sanguínea del VHE en este tipo de pacientes es real.

3.6 Diagnóstico

3.6.1 Detección molecular

La detección molecular del VHE es un claro indicador de infección activa y, por tanto, la herramienta más importante para el diagnóstico de la enfermedad en fase temprana. El ARN se puede detectar desde aproximadamente el sexto día tras la infección hasta 40 días después de la misma (216, 227). La detección del ARN viral se lleva a cabo por transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa, RT-PCR (60, 75, 103).

La disponibilidad de un número cada vez mayor de secuencias de distintos genotipos procedentes de diferentes regiones geográficas y de varias especies, ha permitido el desarrollo de oligonucleótidos específicos que reconocen regiones conservadas del genoma, facilitando de este modo la detección del VHE mediante RT-PCR “caseras” para todos los genotipos descritos. La detección del ARN se puede llevar a cabo en sueros de fase aguda, bilis, tejidos, heces, aguas contaminadas y aguas residuales (43, 49, 103, 149).

Recientemente se están desarrollando métodos de detección del ARN viral por RT-PCR a tiempo real (105, 168) que son efectivos en la cuantificación del ARN viral y más sensibles que las PCR convencionales. Así, por ejemplo, se han desarrollado dos RT-PCR a tiempo real (77), una que usa sondas del tipo TaqMan y otra del tipo PriProEt, que detectan un amplio rango de variantes del VHE de diferentes genotipos y distintos hospedadores con una sensibilidad de detección de menos de 20 equivalentes genómicos por reacción (157).

Otras técnicas de detección molecular del virus, tales como la detección de VLP en heces por microscopía electrónica (15, 95) o el uso de microchips (139), no suelen utilizarse en el diagnóstico rutinario debido a su elevado coste en tiempo y dinero.

Hace poco se ha desarrollado un sistema de inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA) indirecto consistente en la detección de cápsidas proteicas del VHE en sueros usando una combinación de anticuerpos monoclonales frente al VHE (256). La detección de este antígeno del VHE se puede llevar a cabo al mismo tiempo que la detección del ARN del VHE, si bien su persistencia es de cuatro semanas menos que la del ARN (157).

3.6.2 Detección serológica

Como en otras muchas infecciones víricas, el ELISA es la herramienta de diagnóstico principal para la detección de anticuerpos específicos frente al VHE. En el curso normal de la infección por el VHE las primeras inmunoglobulinas que aparecen son las de tipo M (IgM), que permanecen elevadas durante unos dos meses después de la infección y desaparecen a los 4 ó 5 meses (63). Por lo tanto, un resultado positivo en la detección de IgM específica del VHE es indicativo de una infección en fase aguda o relativamente reciente. De cualquier modo, dado que las IgM decaen rápidamente, por lo que en poco tiempo sus valores son indetectables y que en muchos casos la enfermedad cursa de forma subclínica, su utilidad es relativa. Las IgA también pueden ser útiles, al igual que las IgM, como indicadores de una infección activa o reciente.

Por su parte, las IgG se detectan poco después de la aparición de las IgM y su título aumenta en el transcurso de la infección de fase aguda a fase convaleciente. Las IgG son de larga duración y suelen mantenerse elevadas entre 1 y 5 años después de la infección, (63), pudiendo permanecer detectables hasta 14 años ó más (118), por lo que son las más usadas habitualmente en los estudios epidemiológicos. La detección de IgG específica del VHE, aun no siendo una prueba concluyente de una infección activa por el VHE, puede contribuir al diagnóstico de hepatitis E aguda cuando sus títulos son elevados, o cuando se observa un incremento de los mismos en muestras consecutivas del mismo paciente.

Tal y como se ha comentado con anterioridad, las proteínas estructurales ORF2 y ORF3 del VHE son las más inmunogénicas y las que presentan más epítomos antigénicos (56, 113, 114). Por esta razón, los ELISA desarrollados hasta el momento se basan en el uso de estas proteínas recombinantes, o de péptidos derivados de ellas, expresados en diferentes sistemas. Así, se han desarrollado ELISA basados en proteínas recombinantes (244), proteínas de fusión y péptidos sintéticos (171) expresados en *Escherichia coli*, así

como en células (83, 87, 262) y larvas de insecto (205) infectadas con baculovirus recombinantes. Además, también se han expresado VLP en células de insecto (136).

Los inmunoensayos desarrollados con estos antígenos recombinantes se han usado tanto para la detección de IgM e IgG, como de IgA, aunque la utilidad diagnóstica de este último está aún en discusión. Mientras que hay autores que afirman que la detección de IgA es de gran utilidad en el diagnóstico de una infección reciente con el VHE, bien por sí misma o junto con la detección de IgM (216, 227), otros concluyen que la detección de IgA es de escaso valor para el diagnóstico de hepatitis E aguda temprana, especialmente si la infección se debe a VHE de genotipo III (89).

Los estudios comparativos de la utilidad de distintas proteínas recombinantes del VHE para el diagnóstico de hepatitis E han mostrado que la validez antigénica de la proteína ORF3 es comparativamente menor que la de ORF2, la cual presenta mayor sensibilidad para la detección de inmunoglobulinas específicas (71). Por otra parte, hay estudios que indican que los antígenos derivados de virus aislados de humano o de cerdo son igualmente eficaces en la detección de anticuerpos en muestras de ambas especies (12, 59).

En la actualidad los dos ELISA comerciales más usados para la detección de IgG específicas del VHE son el de los laboratorios Abbott que incorpora dos proteínas recombinantes de ORF2 y ORF3 de la cepa de Birmania (genotipo I) y el de los laboratorios Genelabs, que utiliza cuatro fragmentos proteicos recombinantes de ORF2 y ORF3 de una cepa de Birmania y de otra mexicana (genotipo II). Los laboratorios Genelabs también han desarrollado recientemente un ELISA comercial para la detección de IgM específica del VHE. Así mismo hay disponible en el mercado un ensayo de *Western Blot* comercial para la detección de IgG e IgM específicas (RecomBlot, Mikrogen) que utiliza diferentes fragmentos recombinantes: un fragmento del N-terminal, tres del C-terminal, uno del fragmento medio de la proteína ORF2 y otro fragmento de la proteína ORF3 expresados como proteínas de fusión. En cualquier caso, todos los sistemas comerciales disponibles están desarrollados para su uso en humanos.

Las diferencias encontradas en los estudios de seroprevalencia en distintas regiones endémicas y no endémicas han puesto en entredicho la fiabilidad de los sistemas de diagnóstico empleados, tanto comerciales como “caseros”. Así, por ejemplo, un estudio comparativo de diferentes ELISA “caseros” puso de manifiesto una amplia variación en la

sensibilidad de los mismos, que iba del 17 al 100% y una concordancia en la detección de sueros reactivos que variaba del 0 al 89% (144). En otro estudio llevado a cabo usando ELISA “caseros” con antígenos derivados de aislados de cerdo y humano, se observó una concordancia muy elevada entre ambos antígenos en la detección de IgG e IgM pero una disminución de la sensibilidad cuando el ELISA empleado era comercial (12). A pesar de ello, varios estudios comparativos sostienen que los estuches comerciales presentan una buena especificidad, sensibilidad y reproducibilidad (159).

Dado que el VHE parece presentar un único serotipo, inicialmente el uso de antígenos de un genotipo concreto no debería comprometer la detección de sueros de individuos y/o animales infectados con diferentes genotipos, tal y como indican varios estudios (12, 59). Sin embargo, también se ha descrito que el uso de ELISA basados en antígenos de genotipo I y II pueden no ser eficaces para el diagnóstico de casos de hepatitis E de genotipo I y III en condiciones de bajo endemismo, como en el caso de Holanda (88), o para el diagnóstico de casos esporádicos en regiones endémicas, como por ejemplo en China, donde circulan frecuentemente el genotipo I y el IV. Hay que resaltar que los estudios que apoyan que la utilidad de antígenos en la detección serológica del VHE es independiente de genotipo, se llevaron a cabo siempre con ELISA caseros, mientras que en los casos contrarios, se emplearon estuches comerciales.

Recientemente, también se ha desarrollado un test basado en inmunocromatografía para la detección de IgM específicas en pacientes con hepatitis E aguda que ha mostrado muy buena concordancia con los sistemas de ELISA. Este test, basado en un fragmento de la proteína de fusión ORF2 expresada en *Escherichia coli* y en un anticuerpo monoclonal frente a esta proteína, utiliza la nueva tecnología de flujo-reverso y es capaz de dar un resultado en 2 ó 3 minutos. Sin embargo y aunque presenta buena especificidad frente al factor reumatoide, puede tener reactividad cruzada cuando estos factores reumatoides están presentes en alta concentración (42), como ocurre con la mayoría de los sistemas de detección de IgM.

4. CRUZANDO LA BARRERA DE ESPECIE

4.1 El VHE en cerdos domésticos

En 1990 Balayan y colaboradores describieron por primera vez la infección experimental de cerdos domésticos con una cepa humana del VHE procedente de Kirguizistán (16). La primera evidencia de infección natural de cerdos con el virus fue reportada por Clayson y colaboradores en 1999, quienes detectaron la presencia de IgG y ARN, específicos del VHE, en cerdos de Nepal (35). La primera caracterización de una cepa del VHE de origen animal ocurrió en 1997, cuando Meng y colaboradores caracterizaron una cepa del virus obtenida de un cerdo en Estados Unidos (153).

La infección experimental de cerdos domésticos con el VHE humano o porcino ha mostrado la susceptibilidad de éstos a la infección, si bien ésta se desarrolla de forma asintomática, no observándose signos clínicos de enfermedad. De hecho, las enzimas hepáticas se mantienen en niveles normales, a pesar de que se excreta virus en heces en grandes cantidades (79, 151-153). Posteriormente, análisis más exhaustivos de la infección incluyendo la observación histopatológica de los tejidos hepáticos, mostraron que, en algunos casos, puede darse una hepatitis leve o moderada (49, 153). Por otra parte, el transcurso de la infección en el cerdo es similar a la de los humanos en cuanto al comienzo y duración de la viremia y de los anticuerpos específicos. El ARN del virus, además de detectarse en suero y heces, también se ha detectado en bilis, hígado, nódulos linfáticos, intestino delgado y grueso, colon y, en menor medida, en estómago, bazo, riñón, tonsila, glándulas salivales y pulmón (44, 49, 245).

A fecha de hoy se han caracterizado cepas porcinas en numerosos países incluyendo España (49, 65, 206), Holanda (193, 194, 238), Estados Unidos (93, 153), Canadá (253), Nueva Zelanda (69), India (10), Corea (45, 121), Japón (165, 197, 217), Taiwán, (91) y Camboya (34). La mayoría de estas cepas porcinas son de genotipo III, excepto algunos casos de Japón y de la India que pertenecen al genotipo IV, y la cepa de Camboya que es la única cepa porcina descrita de genotipo I. La prevalencia de anticuerpos específicos frente al virus hallada en el ganado porcino a nivel mundial es muy variable, aunque generalmente elevada, incluso en regiones donde el virus no se considera endémico al igual que ocurre con los datos de prevalencia de ARN. De cualquier forma, en general la prevalencia de ARN es mayor en animales jóvenes, mientras que los adultos

presentan una mayor presencia de anticuerpos específicos. En la tabla 1 se muestran algunas de estos datos de prevalencias de anticuerpos y ARN específicos del VHE.

Tabla 1. Prevalencia de anticuerpos y ARN en cerdos domésticos.

PAÍS	PREVALENCIA EN CERDOS				REFERENCIA
	% IgG anti-VHE		% ARN del VHE		
	Individuos	Granjas	Individuos	Granjas	
España	71,4%				Peralta 2009 (175)
			38%		De Deus 2007 (49)
			23%		Fernández-Barredo 2007 (65)
	42%	98%			Seminati 2008 (206)
Holanda			22%		Van der Poel 2001 (238)
			55%		Rutjes 2007 (193)
				53%	Rutjes 2009 (194)
EEUU			35%	54%	Huang 2002 (93)
Canadá	80%		60%		Yoo 2001 (253)
India	43%		5%		Arankalle 2002 (10)
Japón	56%		4%		Takahashi 2005 (217)
	75%		2%		Sakano 2009 (197)
Corea	15%		2%		Choi 2003 (45)
			18%	100%	Kim 2008 (121)

En los últimos años se han llevado a cabo estudios en el ganado porcino que han demostrado la transmisión del virus por contacto de cerdos sanos con cerdos infectados experimentalmente por vía intravenosa. Además, se ha comprobado que los cerdos infectados por contacto son, a su vez, una fuente de infección por contacto de cerdos sanos susceptibles. En estos experimentos se demostró que transcurrían 6 días hasta que los cerdos sin infectar que estaban en contacto con animales infectados empezaban a excretar virus en las heces (24). Estos trabajos ponen de manifiesto la rápida transmisión del virus entre el ganado porcino y el riesgo que esto conlleva en el establecimiento continuo de la

enfermedad en las cabañas porcinas de regiones donde no se había considerado, hasta el momento, endémica.

4.2 El VHE en otros animales

Además de en cerdos domésticos, el VHE también se ha detectado en otros animales. Se han analizado secuencias del VHE recuperado de mangostas en Okinawa, (Japón) en las que también se encontró serología positiva (161). También se ha aislado el virus en el 4% de los jabalíes analizados en Holanda (194), en el 1,1% de los de Japón (197), y en el 19,6% de los de España (48). Del mismo modo, en Asia se han secuenciado genomas del VHE a partir de muestras de ciervo (215). Además, y de modo esporádico, se ha reportado el aislamiento de RNA del virus en roedores del valle de Katmandú, en Nepal (85), en caballos en Egipto, donde se halló una prevalencia de ARN del 4% (195), y en China (261). Si bien estos datos deben tomarse con precaución hasta su confirmación por otros estudios independientes.

Tabla 2.: Detección de serología positiva en otros animales domésticos distintos al cerdo.

ESPECIE	PREVALENCIA	PAÍS	REFERENCIA
Ratas:	44-90%	E.E.U.U.	Kabrane-Laizizi 1999b (106)
	12%	Nepal	He 2002 (85)
Otros roedores:	2-22%	India	Arankalle 2001 (11)
	12%	Nepal	He 2002 (85)
	50%	Brasil	Vitral 2005 (240)
Patos:	13%	China	Zhang 2008 (261)
Gatos:	33%	Japón	Okamoto 2004 (166)
	11%	España	Peralta 2008 (172)
Perros:	22%	India	Arankalle 2001 (11)
	24%	España	Peralta 2006 (174)
Vacas	4-7%	India	Arankalle 2001 (11)
Ovejas:	19 %	España	Peralta 2008 (172)
Cabras:	0,6%	España	Peralta 2009 (172)
Caballos:	13%	Egipto	Saad 2005 (195)
	16%	China	Zhang 2008 (261)

Se ha detectado la presencia de anticuerpos específicos frente al VHE en especies animales distintas al cerdo (Tabla 2). También se ha detectado serología positiva en primates no humanos, tales como macacos *Rhesus*, *Macaca mulata* y *Macaca Fuscata* (90, 234).

4.3 El VHE aviar

En el año 2001 Haqshenas y colaboradores (81) identificaron y caracterizaron genéticamente un nuevo virus relacionado con el VHE de humanos a partir de muestras de bilis de gallinas que padecían el síndrome de hepatomegalia-esplenomegalia (HSS), síndrome emergente en gallinas de Norte América del que se desconocían hasta entonces las causas. Basándose en similitudes de organización genómica y de identidad de secuencias con el VHE de humanos y de cerdos lo denominaron VHE aviar. Estudios genéticos de la proteína de la cápsida del VHE aviar han mostrado la existencia de epítomos antigénicos compartidos con el VHE de humanos y cerdos y con otro virus de gallinas de Australia, el BLSV (del inglés, *big liver and spleen disease virus*) (80).

Cuando se logró determinar la secuencia genómica completa del VHE aviar, se comprobó que la identidad con el VHE humano y porcino era de alrededor del 50% (94). En estos trabajos se observaron variaciones genéticas importantes, como inserciones y deleciones, particularmente en ORF1. A pesar de ello, y dada la conservación de motivos en los dominios funcionales putativos de ORF1 (94), actualmente se considera que el VHE aviar es un miembro del género *Hepevirus* que comparte una identidad nucleotídica del 80% con el BLSV (81). En cualquier caso, hasta la fecha no se ha conseguido una infección experimental de monos *Rhesus* con el VHE aviar (94).

Un estudio reciente llevado a cabo en la población avícola de diferentes granjas en España ha mostrado la presencia del ARN del VHE aviar en algunos animales, de modo que el 89,7% de las granjas avícolas presentaban serología positiva y la prevalencia por individuos variaba entre el 20% y el 80% (173).

4.4 Zoonosis

La detección del VHE en cerdos fue la primera pista que indujo a pensar que la hepatitis E podía ser una zoonosis. Las primeras cepas porcinas secuenciadas presentaban una gran similitud genética con las de humanos de las mismas regiones geográficas. Estas

similitudes entre diferentes especies eran mayores que las que se describían para una misma especie procedente de distintas regiones geográficas (91, 151, 250).

La observación de una elevada incidencia de la infección por el VHE en el ganado porcino dio origen al estudio de su incidencia en personas que estaban en contacto directo con cerdos. Los primeros estudios epidemiológicos de estas poblaciones se llevaron a cabo en regiones endémicas. Así, en China se observaron prevalencias del 100% en manipuladores porcinos, frente al 55% observado en donantes de sangre. En un estudio similar (150) se observó un 71% de prevalencia en personas relacionadas con el sector porcino; sin embargo, como los propios autores exponen, estos estudios se llevaron a cabo en un grupo muy reducido de la población y en regiones de alto endemismo, en las que hay que tener en cuenta que las tasas de prevalencia del virus en la población general son de por sí muy elevadas. Estudios posteriores de regiones endémicas han sugerido que existe un mayor riesgo de infección en estos grupos de población. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo en China indica que el riesgo de exposición en personas relacionadas con la cría de cerdo es un 74% mayor que el de personas con otras ocupaciones (150).

Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en áreas industrializadas de regiones consideradas no endémicas también documentan un mayor riesgo de exposición en personas con ocupaciones relacionadas con el ganado porcino que en la población general. Por ejemplo, en Moldavia se han descrito prevalencias del 51% en granjeros del sector porcino frente al 25% de los sujetos control (52). En Estados Unidos, los estudios realizados con veterinarios del sector porcino mostraron una probabilidad 1,5 veces mayor de presentar serología positiva frente a la población general (154). Otro estudio llevado a cabo en Carolina del Norte reveló un 11% de seroprevalencia en trabajadores del sector porcino frente al 2,1% observado en la población general (246). En España se han reportado prevalencias del 18% en trabajadores relacionados con cerdos frente al 4% de prevalencia encontrada en sujetos control (68). De todos modos, estos resultados aún son controvertidos, puesto que también hay estudios que indican que no hay diferencias entre las poblaciones estudiadas, estén o no en contacto con cerdos (167).

La evidencia de que la hepatitis E es una zoonosis se confirmó tras la descripción de casos de hepatitis aguda por ingesta de carne cruda de un ciervo infectado por el VHE (225). Posteriormente se han documentado otros casos de hepatitis E fulminante en Japón que también se relacionan con la ingesta de hígados de cerdos infectados (252). De la misma forma y tras detectar hígados de cerdo infectados en mercados de Holanda (25) y de

Estados Unidos (64), se demostró la capacidad infecciosa del virus tras la inoculación de cerdos con los extractos obtenidos de los hígados. Finalmente, se ha descrito recientemente un caso de una posible transmisión zoonótica de un cerdo mascota a su cuidador (187).

Para establecer el riesgo de transmisión zoonótica del VHE y su implicación en la epidemiología de la enfermedad hay que diferenciar entre las regiones endémicas y no endémicas. Los únicos genotipos conocidos hasta la fecha responsables de brotes epidémicos en países endémicos son el genotipo I y II. Hasta el momento sólo se ha aislado una cepa porcina que pertenezca a genotipo I, el resto siempre han sido de genotipo III y IV. Estos datos parecen sugerir que la transmisión zoonótica del virus, al menos de origen porcino, no tiene gran relevancia en los brotes epidémicos de la enfermedad. En cualquier caso, hay que tener en cuenta la gran cantidad de especies animales, diferentes al cerdo, en las que se ha descrito la presencia de anticuerpos específicos contra él. A pesar de ello, en la mayoría de las especies donde se ha detectado serología positiva no se ha podido aislar ARN del virus, lo que ha impedido establecer los genotipos circulantes en estos animales y, por lo tanto, su importancia real como reservorios zoonóticos del virus o su posible implicación en los brotes epidémicos. Además, en regiones endémicas, los genotipos circulantes en la mayor parte de la población humana no se corresponden con los presentes en las poblaciones porcinas (10), a diferencia de lo que ocurre en regiones industrializadas no endémicas.

OBJETIVOS

1. Obtención y caracterización de formas recombinantes de la proteína de la cápsida ORF2 del VHE.
2. Desarrollo y validación de sistemas de diagnóstico basados en las proteínas recombinantes generadas.
3. Estudio de la prevalencia del VHE en la cabaña porcina española.
4. Estudio de la capacidad inmunogénica en el modelo murino de las proteínas recombinantes generadas.
5. Estudio de las vías de transmisión vertical en el modelo murino de la inmunidad adquirida tras la inmunización con las proteínas recombinantes generadas.
6. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales (AcMo).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.1 Porcinas

EL ARN necesario para la obtención de los fragmentos génicos empleados para la generación de las proteínas recombinantes usadas en este trabajo se extrajo de una muestra de heces de un cerdo infectado de forma natural con el virus de la hepatitis E, amablemente cedida por la Dra. María Teresa Pérez-Gracia (Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia). Esta y otras muestras de heces de la misma procedencia se emplearon como controles positivos en la amplificación, mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), del ARN del VHE en muestras porcinas.

Para el estudio de la prevalencia del VHE en la cabaña porcina española se emplearon 1141 sueros porcinos, correspondientes a 760 cerdas adultas reproductoras (mayores de 6 meses de edad) y a 620 animales jóvenes, lactantes, de transición, de engorde o de cebo (menores de 6 meses de edad). Las muestras se obtuvieron en 85 granjas, algunas de sólo animales jóvenes, otras de adultos y otras de explotaciones mixtas con ambos tipos de animales. Las granjas estaban localizadas en 6 provincias correspondientes a 4 comunidades autónomas. En 3 de las comunidades autónomas (Castilla y León, Andalucía y Cataluña) todas las granjas estaban localizadas en la misma provincia (3 en Salamanca, 1 en Jaén y 1 en Lérida), mientras que en Aragón las granjas estaban situadas en tres provincias (2 en Huesca, 76 en Zaragoza y 2 en Teruel). Parte de las muestras fueron recolectadas durante el desarrollo del proyecto PORCIVIR (CONSOLIDER, CSD2006-0007) en el que participamos activamente y parte fueron suministradas gentilmente por la Dra Olivia Gironés (Universidad de Zaragoza).

Como controles para los ensayos serológicos se emplearon sueros porcinos, tanto positivos como negativos, que habían sido previamente caracterizados (206) y que fueron gentilmente cedidos por la Dra. Marga Martín (CRESA, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona).

1.2 Humanas

Las muestras humanas empleadas como controles positivos y negativos en ensayos procedían de Cataluña (30) y Holanda (88) y fueron amablemente cedidas por la Dra. María Buti (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) y el Dr. Erwin Duizer (National Institute for Public Health and the Environment. RIVM, Bilthoven). Además, también se utilizaron

sueros de pacientes tunecinos en hemodiálisis, no caracterizados, que fueron cedidos por el Dr. Jawhar Gharbi (Laboratoire des Maladies Transmisibles, Université de Monastir, TUNEZ).

2. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1 Extracción de ARN

Previamente a la extracción del ARN viral, las heces se procesaron mezclando partes equivalentes del extracto fecal con una solución salina de PBS 1x [137 Mm de NaCl, 2.7 Mm de KCl, 10 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.8 Mm de KH_2PO_4 (Merck)] hasta adquirir una composición homogénea. Se centrifugaron a 9000 r.p.m. durante 15 min a 4°C, descartándose el precipitado y guardando el sobrenadante a -80 °C hasta su utilización. El ARN total se extrajo de las de heces procesadas, o de los sueros, empleando un estuche comercial para extracción de ARN de origen viral, QIAmp®viral RNA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se extrajo en un volumen final de 60 µl de agua libre de ARNasas.

2.2 Obtención y amplificación de los ADNc

La síntesis de ADN complementario (ADNc) y su posterior amplificación se llevó a cabo por RT-PCR, usando el estuche comercial SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de 25 µl, consistente en 10 µl del ARN extraído y 15 µl de la mezcla de los reactivos necesarios para la reacción. El agua usada para la mezcla de la reacción se trató previamente con DEPC, dietil pirocarbonato (Sigma), un inhibidor de ARNasas. En algunos casos se llevó a cabo una PCR anillada en un volumen final de reacción de 50 µl. El tampón de reacción contenía una mezcla equimolecular (10 mM) de dNTP's (Takara) y el volumen final se completó con agua milliQ previamente esterilizada. Dependiendo de las necesidades específicas de amplificación se emplearon diferentes estuches comerciales: Expand High Fidelity PCR System (Roche) o el Pfx50™DNA Polymerase (Invitrogen), tal y como se especifica en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Estuches, reactivos y condiciones de RT-PCR y PCR anillada.

ESTUCHE COMERCIAL	REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq (INVITROGEN) (1)	Tampón 2x con MgCl ₂ Oligonucleótidos 5 µM RT-Taq polimerasa	1x 0.24 µM 1 U
Expand High Fidelity PCR System (Roche) (2)	Tampón 10x MgCl ₂ 25 mM Oligonucleótidos 5 µM dNTP 10 mM Expand PCR High Fidelity 3.5 U/ µl	1x 0.5 mM 0.24 µM 0.4 mM 1 U
Pfx50™ DNA Polymerase (Invitrogen) (3)	Tampón 10x con MgSO ₄ 12 mM Oligonucleótidos 5 µM dNTP 10 mM Pfx50™ DNA Polymerase 5 U/µl	1x 0.3 µM 0.3 mM 1 U

Los números entre paréntesis (1, 2 y 3) hacen referencia a su uso en las diferentes reacciones tal y como se indica en la Tabla 4.

En todos los casos en los que se amplificaban secuencias que se iban a clonar o secuenciar con posterioridad se usaron enzimas de alta fidelidad con actividad correctora de errores. Las temperaturas de elongación se usaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes para el correcto funcionamiento de las enzimas con actividad polimerasa y el resto de los pasos se optimizaron en función de los cebadores empleados y los fragmentos a amplificar.

Tabla 4. Condiciones de las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos empleadas.

Molde	Cebadores oligonucleótidos*	Condiciones de la reacción	Producto	ESTUCHE**
10 µl de ARN extraído de muestras de heces porcinas, o de sueros humanos o porcinos	Sentido: 3156F Antisentido: 3157R2	45°-----1h 94°-----3min 94°-----1min 42°-----1min 72°-----2min 72°-----10min x40	791 pb nt: 5687-6477 de ORF2	(1)
5 µl de ADNc correspondiente a 790 pb nt: 5687-6455 de ORF2	Sentido: 3158F2 Antisentido: 3159R	94°-----2 min 94°-----1min 42°-----1min 72°-----2min 72°-----10min x40	350 pb nt: 5970-6319 de ORF2	(2)
5 µl de ADNc correspondiente a 790 pb nt: 5687-6455 de ORF2	Sentido: 3158F2 Antisentido: 3159R	94°-----2 min 94°-----30seg 45°-----1min 68°-----3min 68°-----10min x40	350 pb nt: 5970-6319 de ORF2	(3)
ARN extraído de U1, muestra de heces de un cerdo infectado con el VHE.	Sentido: HE-E-Eco-F Antisentido: HE-E-Bam-R	45°-----1h 94°-----2min 94°-----30seg 45°-----1min 68°-----3min 68°-----10min x40	2015 pb ORF2-VV nt:5129-7143 de ORF2	(1)

* Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 5.

** Estuches comerciales empleados descritos en la Tabla 3.

Tabla 4 (continuación). Condiciones de las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos empleadas.

Molde	Cebadores oligonucleótidos*	Condiciones de la reacción	Producto	ESTUCHE**
90 ng del plásmido TOPO-TA-ORF2-VV	Sentido: HE-Bam-Bac-F Antisentido: HE-Kpn-Bac-R	94°C-----1min 94°C-----1min 40°C-----1min 72°C-----3min x5 94°C-----1min 47°C-----1min 72°C-----2min x35 72°C-----10min	ORF2-BAC	(2)
4 ng del plásmido TOPO-TA-ORF2-BAC	Sentido: T-HE-Bam-Bac-F Antisentido: HE-Kpn-Bac-R	94°C-----2min 94°C-----30seg 45°C-----1min 68°C-----3min x40 68°C-----10min	$\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-BAC	(2)
4 ng del plásmido TOPO-TA-ORF2-BAC	Sentido: T-HE-Eco-Vcc-F Antisentido: HE-E-Bam-R	94°C-----2min 94°C-----30seg 45°C-----1min 68°C-----3min x40 68°C-----10min	$\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-VV	(2)
10 ng del plásmido pRB21-ORF2 y/o pRB21- Δ -ORF2	Sentido: VV-ORF2-HindIII y/o VV- Δ -ORF2-HindIII Antisentido: VV-ORF2-EcoRI	94°C-----1min 94°C-----1min 40°C-----1min 72°C-----3min x5 94°C-----1min 47°C-----1min 72°C-----2min x35 72°C-----10min	VV-ORF2-HindIII/EcoRI y/o VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-HindIII/EcoRI	(2)

* Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 5.

** Estuches comerciales empleados descritos en la Tabla 3.

2.3 Oligonucleótidos

Para la amplificación de los fragmentos génicos usados en la posterior obtención de las proteínas recombinantes se utilizaron oligonucleótidos cebadores (Invitrogen), que se diseñaron en el laboratorio basándose en similitudes de nucleótidos de aislados del VHE de

genotipo III presentes en los bancos públicos de genes. Para la detección del ARN del VHE en muestras de la cabaña porcina española se emplearon oligonucleótidos cebadores modificados a partir de los originalmente descritos por Meng y colaboradores (125). Por otra parte, para la obtención de diversos fragmentos génicos y su posterior secuenciación se diseñaron una serie de oligonucleótidos que cubrían en ambos sentidos el gen completo del ORF2 del VHE. Los oligonucleótidos empleados se describen en la tabla 5. Todas las posiciones de los nucleótidos hacen referencia a la cepa de genotipo I Bur82 (número de acceso en GeneBank M73218).

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados.

CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5'-3') (Secuencia Original)	POSICIÓN*	OBSERVACIONES
VHE 1F	ACCCTGTTTAATCTTGCTGA	6257-6276	
VHE 2R	TTATCCTGCTGAGCATTCTC (gagaatgctcagcaggataa)	639-6414	
3156 F	AATTATGCCAGTACCGGGTTG	5687-5708	Referencia 125
3157 R-2	TCATAGTCTTGTATAACACACG (cgtgtggtatacaagactatga)	6455-6477	
3158 F-2	TGGTCATGCTTTGTATTCATGG	5970-5991	
3159 R	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC (gacagaattgatttcgtcggt)	6298-6319	Referencia 125
HE-E-Eco-F	GCCCATGAATTCACCATGCGCC	5129-5150	Introduce un sitio EcoRI en 5'
HE-E-Bam-R	ACAAAAGGGATCCATTAAGACTCCCGGT (accgggagtcctaatggatccctttgt)	7115-7143	Introduce un sitio BamHI en 3'
HE-Bam-Bac-F	CCATGAGGATCCCATGCGCCCTAG	5134-5157	Introduce un sitio BamHI en 5'
HE-Kpn-Bac-R	AAAGGGGTACCATAAGACTCCCG (ccgggagtccttatggtacccttt)	7117-7140	Introduce un sitio KpnI en 3'
T-HE-Eco-VV	GCGGAATTCATGGCTGTTTCACCAGC	5468-5493	Introduce un sitio EcoRI en 5' y un ATG iniciador de ORF2

* Corresponde a la cepa de genotipo I Bur82 (GeneBank M73218).

Tabla 5 (continuación). Oligonucleótidos empleados.

CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5'-3') (Secuencia Original)	POSICIÓN*	OBSERVACIONES
T-HE-Bam-Bac-F	GCTGCG <u>GATCCA</u> ATGGCTGTTTCACC	5465-5490	Introduce un sitio BamHI en 5' y un ATG iniciador de ORF2
VHE/6547F	GAGAATGCTCAGCAGGATAAG	6395-6415	
VHE/5933R	GGTGTAGTTGTAGTCTGAGGCC (ggcctcagactacaactacacc)	5781-5802	
HEV-5462 R	CAGTTGGGGTAGATCGACGACG (cgctgctgatctacccaactg)	5441-5462	
VV-ORF2-HindIII-F	TAAATA <u>AAGCTT</u> TCACCATGCGCC		Introduce un sitio HindIII en 5' en ORF2
VV-Δ-ORF2-HindIII-F	TAAATA <u>AAGCTT</u> TCATGGCTGTTTC		Introduce un sitio HindIII en 5' en ORF2
VV-ORF2-EcoRI-R	GCTCTCCGAATTCATAAAGACTCC (ggagtctt <u>atgaattc</u> ggagagc)		Introduce un sitio EcoRI en 3', elimina el codón stop de ORF2 e introduce uno nuevo.

* Corresponde a la cepa de genotipo I Bur82 (GeneBank M73218).

En rojo aparecen las modificaciones con relación a la secuencia original. Los cambios introducidos para crear sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción aparecen subrayados.

2.4 Electroforesis de los ácidos nucleicos

La visualización del ADN de los fragmentos amplificados y clonados se llevó a cabo en geles de agarosa (Promega) de porcentaje variable, entre el 1% y el 2%, en función del tamaño de los fragmentos a visualizar. Los geles se prepararon a una concentración final de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, BrEt (Genaxys Biotechnology) para su posterior visualización con luz ultravioleta. El tampón de electroforesis contenía TAE + BrEt (4.84 g/l de Tris (hidroximetil) aminometano (Merck), 2 ml/l de EDTA 0.01 M pH8 (Fisher), 1.14 ml/l de ácido acético glacial (Merck) y H₂O destilada, con una concentración final de BrEt de 0.5 µg/ml). Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje variable limitado por un máximo amperaje de 100 mA. Cuando se iba a proceder a la posterior purificación de las bandas de ADN de los geles, éstos se prepararon con agarosa de bajo punto de fusión, Agarosa LM-SIEVE (Pronadisa), y en este caso el amperaje no superó los 80 mA. Para la estimación del tamaño y la masa de los fragmentos amplificados se emplearon diferentes

marcadores de peso molecular en función de los requerimientos específicos: Lambda DNA/HindIII Marker 2 y Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3 (Fermentas) para fragmentos de alto peso molecular y 100 bp DNA Ladder (Bioron) para fragmentos de bajo peso molecular.

2.5 Purificación de los ácidos nucleicos

Para la secuenciación y/o clonación de los fragmentos génicos amplificados, éstos fueron purificados mediante estuches comerciales siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En la purificación de fragmentos de PCR se empleó el estuche comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y para los purificados de bandas de geles de agarosa de bajo punto de fusión, se usó el estuche QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

3. CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS GÉNICOS

3.1 Vectores

Para la clonación de los fragmentos génicos se emplearon diferentes vectores con el fin de obtener las proteínas recombinantes generadas en distintos sistemas de expresión.

Para la obtención de las proteínas recombinantes expresadas en baculovirus los fragmentos génicos correspondientes a las proteínas deseadas se clonaron en el vector pFastBac (Invitrogen) modificado mediante la inclusión de un péptido señal de la melitina (pFastBacMel2) para mejorar la solubilidad de la proteína, que fue gentilmente cedido por el Dr. José M. Escribano (Departamento. Biotecnología, INIA). La expresión de los genes clonados en este vector se produce desde el promotor de la polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear múltiple de la polilla *Autographa californica*, que tiene una expresión muy elevada en células de insecto y es un gen prescindible para la infección. Este casete está flanqueado en ambos lados por secuencias del transposón Tn7. El vector incluye también un gen de resistencia a gentamicina. El vector pFastBacMel2 se modificó posteriormente de modo que se le incorporó una secuencia que codificaba para una cola de 6 histidinas (His) con el fin de facilitar la posterior purificación de las proteínas recombinantes y su reconocimiento mediante técnicas inmunológicas.

Las proteínas expresadas en virus vaccinia se clonaron en el vector pRB21, cedido por el Dr. Rafael Blasco (Departamento de. Biotecnología, INIA). Este es un vector

derivado del pGEM7 que contiene el promotor sintético vp37 de la proteína del virus vaccinia F13L de expresión temprana / tardía (22). Además también se empleó el vector pRB21-PS-Myc-His que incorpora modificaciones llevadas a cabo en el laboratorio del Dr. Blasco. Estas modificaciones consisten en la adición de la secuencia de un péptido señal, que posteriormente es sustituida por los fragmentos a clonar, una secuencia que codifica un epítipo Myc para su posterior aplicación en técnicas inmunológicas y una secuencia que codificaba un tallo de 6 His para su posterior utilización en técnicas inmunológicas y de purificación.

Para la clonación de los fragmentos génicos en los vectores pFastBacMel2 y pRB21-Myc-His se empleó el estuche comercial T4 DNA Ligase (Roche).

Tabla 6. Reacciones usadas en los procesos de clonación

	Reacción control ligasa +	Reacción control ligasa -	Reacción ligación inserto vector
Vector	50-100 ng	50-100 ng	50-100 ng
Tampón ligasa 10x	1x (1.5µl)	1x (1.5µl)	1x (1.5µl)
Inserto	-----	-----	Relación inserto/vector entre 3 y 5
Ligasa 1 U/µl	1U (1 µl)	-----	1U (1 µl)
Volumen final	15 µl	15 µl	15 µl
H₂O milliQ estéril	Hasta completar el volumen necesario	Hasta completar el volumen necesario	Hasta completar el volumen necesario

La reacción de ligación (Tabla 6) se llevó a cabo durante 2h a temperatura ambiente siguiendo una relación inserto vector que se calculó de la siguiente manera:

$$\text{ng Inserto} = (\text{ng Vector} \times \text{Kb Inserto/Kb Vector}) \times (\text{relación Inserto/Vector})$$

En algunos casos, por requerimientos de masa, se incluyeron los fragmentos génicos de las proteínas a clonar o de los fragmentos a secuenciar, en vectores pCR[®]4-TOPO[®] incluidos en el estuche comercial TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) y/o en vectores pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] incluidos en el estuche comercial pcDNA3.1/V5-His[®]TOPO[®] TA Expression Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de los fabricantes y aprovechando las colas de adeninas que introducen las enzimas Taq polimerasas al final de

los extremos de los fragmentos amplificados por PCR para su clonación. También se empleó el vector comercial pEGFP-C2 (Clontech) para la generación de las proteínas recombinantes de ORF2 fusionadas a GFP, así como para su uso como control negativo de expresión de GFP en los experimentos realizados con ellas.

3.2 Mutagénesis dirigida

En ocasiones fue necesaria la mutagénesis de nucleótidos del ADN plasmídico para la eliminación y/o la creación de nuevos sitios de reconocimiento por parte de enzimas de restricción, o de codones de terminación de la pauta de lectura aminoacídica. Con este propósito se usó el estuche comercial QuickChange®XL Site-Directed Mutagenesis KIT (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante y oligonucleótidos especialmente diseñados que introducen los cambios deseados. Este sistema se empleó para crear un sitio de restricción Hind III, que flanquea el extremo 5' del péptido señal del vector del virus vaccinia pRB-PS-Myc-His para poder sustituirlo con posterioridad por los insertos ORF2 y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 generados. Así mismo, también se empleó en los plásmidos recombinantes pRB-Myc-His-ORF2* y pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2* con el fin de eliminar un codón de parada de la pauta de lectura.

3.3 Obtención de los plásmidos recombinantes

A continuación se resumen los pasos seguidos en la obtención de los plásmidos recombinantes generados en este trabajo. Muchos de ellos son herramientas intermedias necesarias para la producción de los plásmidos recombinantes empleados en la generación de los virus baculovirus y vaccinia recombinantes finales.

- **TOPO-TA-ORF2-VV**

Proveniente del clonaje del fragmento ORF2-VV, amplificado con los oligonucleótidos HE-E-Eco-F/HE-E-Bam-R por RT-PCR directa bajo las condiciones descritas con anterioridad y purificado, se clonó en el plásmido pCR®4-TOPO®.

- **pRB21-ORF2**

Obtenido tras la digestión del plásmido TOPO-TA-ORF2-VV con las enzimas EcoRI y BamHI que liberan el fragmento ORF2-VV-EcoRI/BamHI. Tras la purificación del mismo, 50 ng del inserto se ligaron con 50 ng del vector pRB21, previamente tratado con las mismas enzimas y purificado.

- **TOPO-TA-ORF2-BAC**

El inserto ORF2-BAC se obtuvo por PCR del plásmido TOPO-TA-ORF2-VV, con los oligonucleótidos HE-Bam-Bac-F/HE-Kpn-Bac-R, bajo las condiciones descritas con anterioridad y, tras purificarse, se clonó en el vector pCR[®]4-TOPO[®].

- **pORF2-BAC**

Este vector, que fue utilizado con posterioridad para la generación del baculovirus recombinante que expresa la proteína ORF2r completa, se obtuvo tras la digestión doble del plásmido TOPO-TA-ORF2-BAC con las enzimas BamHI y KpnI. Posteriormente se purificó el fragmento correspondiente, ORF2-BAC, y 67 ng del mismo se ligaron con 50 ng del vector pFast BacMelB2, previamente digerido con las mismas enzimas y purificado.

- **pRB21- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2**

Se llevo a cabo una PCR sobre el plásmido TOPO-TA-ORF2-VV, con los oligonucleótidos T-HE-Eco-VV/HE-E-Bam-R, bajo las condiciones descritas con anterioridad y se obtuvo el fragmento $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-VV que se purificó. Tras digerirlo con EcoRI y BamHI y su posterior purificación, 26 ng de este inserto se ligaron con 40 ng del vector pRB21 previamente digerido con las mismas enzimas y purificado.

- **p $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-BAC**

Este vector se usó con posterioridad para la obtención del baculovirus recombinante que expresa la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. Para la obtención del inserto se hizo PCR sobre el plásmido TOPO-TA-ORF2-VV con los oligonucleótidos T-HE-Bam-Bac-F/HE-Kpn-Bac-R. El fragmento purificado se digirió con BamHI y KpnI, se purificó de nuevo y 37 ng del mismo se ligaron con 50 ng del vector pFastBacMelB2, previamente digerido con las mismas enzimas y purificado.

- **TOPO-ORF2-HindIII/EcoRI**

Se hizo PCR sobre el plásmido pRB21-ORF2, con los oligonucleótidos VV-ORF2-HindIII-F/VV-ORF2-EcoRI-R bajo las condiciones descritas con anterioridad para obtener el fragmento ORF2-(HindIII/EcoRI) que se purificó y clonó en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®].

- **TOPO- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 HindIII/EcoRI**

El fragmento $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 HindIII/EcoRI, obtenido mediante PCR del plásmido pRB21- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 con los oligonucleótidos VV- Δ -ORF2-HindIII-F/VV-ORF2-EcoRI-R bajo las condiciones descritas con anterioridad, se purificó y clonó en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®].

- **pRB-Myc-His-ORF2***

La obtención de este vector recombinante, usado con posterioridad en la generación del virus vaccinia recombinante, expresa la proteína ORF2r-vv entera y se obtuvo tras la digestión doble del plásmido TOPO-ORF2-HindIII/EcoRI con las enzimas HindIII y EcoRI. A continuación, 50 ng del producto de digestión purificado, ORF2-HindIII/EcoRI, se ligaron con 40 ng del vector pRB-HindIII/EcoRI-Myc-His, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado.

- **pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2***

Este vector se creó para posteriormente obtener el virus vaccinia recombinante que expresa la forma truncada de la proteína de la cápsida del VHE, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv. El inserto $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-HindIII/EcoRI se obtuvo por la digestión doble del plásmido TOPO- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 HindIII/EcoRI con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y, tras su purificación, 40 ng del mismo se ligaron con 40 ng del vector pRB-HindIII/EcoRI-Myc-His que había sido previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado.

- **pRB-Myc-His-ORF2**

Obtenido tras la mutagénesis dirigida del plásmido pRB-Myc-His-ORF2*.

- **pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2**

Obtenido tras la mutagénesis dirigida del plásmido pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2*.

- **p-GFP-ORF2r**

La transfección de este vector en células eucariotas da lugar a la proteína ORF2r fusionada a GFP por su extremo N-terminal. Se obtuvo tras la clonación del fragmento ORF2r, sacado del plásmido pRB-Myc-His-ORF2 por digestión con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y, previa purificación, en el vector comercial pEGFP-C₂.

- **p-GFP- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2**

La transfección de este vector en células eucariotas da lugar a la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r fusionada a GFP por su extremo N-terminal. Se obtuvo tras la clonación del fragmento $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, sacado del plásmido pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 por digestión con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y, previa purificación, en el vector comercial pEGFP-C₂.

3.4 Transformación en bacterias

Previo a la transformación en bacterias electrocompetentes y con el fin de evitar posibles rupturas de las cubetas de electroporación por interferencia de las sales con la corriente eléctrica, se hizo un paso de diálisis de las reacciones de ligación. Las muestras se dializaron sobre filtros de diálisis de 0.025 μ m (Milipore) en agua milliQ durante 1 hora a temperatura ambiente.

La transformación del ADN plasmídico se llevó a cabo en bacterias electrocompetentes, *E.coli* DH5- α (Invitrogen). La electroporación se realizó en cubetas de electroporación (BioRad, 0,1 cm electrode) previamente refrigeradas en hielo. Se transfirió el volumen deseado de la reacción de ligación dializada y 10 μ l de bacterias a la cubeta de electroporación, y se le dio un pulso eléctrico bajo los parámetros de 25 μ FD de capacidad, 200 Ω de resistencia y 1.8 kV de tensión, utilizando el equipo Gene Pulser (BioRad). Inmediatamente tras la electroporación, la mezcla de bacterias se diluyó en 700 μ l de medio SOC (Invitrogen) o de medio LB (10 g/l de bactotripton (Difco), 5 g/l de extracto levadura (Difco), 10 g/l de NaCl y H₂O destilada), previamente atemperado y se incubó a 37°C durante 30-45 minutos. A continuación se sembraron diferentes diluciones en placas de LB-Agar [LB + 15 g/l de agar (Difco)] con 150 μ g/ml de ampicilina (Boehringer Mannheim) y se incubaron toda la noche a 37°C.

3.5 Purificación del ADN de los plásmidos

Se seleccionaron colonias aisladas, que se recogieron con puntas estériles bajo la llama de un mechero de alcohol, y se pusieron a crecer junto con un control negativo de bacterias en 4 ml de medio TB (12 g/l de bactotripton, 24 g/l de extracto de levadura, 4 ml/l de glicerol (Merck), 2.31g/l de KH₂PO₄ 0.17 M, 12.54 g/l de K₂HPO₄ 0.72 M (Fluka), H₂O destilada y ampicilina 150 μ g/ml) durante toda la noche a 37° C en una incubadora (WTC Binder) con agitación a 220 r.p.m.

Las colonias crecidas (3 ml del cultivo) se sometieron al método de lisis alcalina descrito con anterioridad (198) para el aislamiento del ADN del plásmido. Parte del cultivo se mezcló con un 30% de glicerol estéril y se almacenó a -80° C para su posterior utilización. Se hicieron al menos dos réplicas de cada clon de bacterias seleccionado y se guardaron en congeladores distintos.

3.6 Ensayos con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (Roche) se emplearon para el tratamiento de los insertos y vectores correspondientes para su posterior ligación (como paso previo a la secuenciación) y para el chequeo de la presencia del inserto y de su correcta orientación en los posibles clones positivos. En todos los casos se siguieron las instrucciones de los fabricantes.

4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La selección de los clones positivos se llevó a cabo siempre tras el análisis de su secuencia. De igual forma se secuenciaron diferentes fragmentos amplificados de los sueros del estudio de la prevalencia de la cabaña porcina con el fin de determinar el genotipo del virus. Las secuenciaciones fueron realizadas por el servicio de secuenciación del C.I.B. (SECUGEN).

Los alineamientos de secuencias se llevaron a cabo con los programas GeneDoc (www.nrbsc.org/gfx/genedoc/) y/o BLAST (www.nlm.nih.gov/BLAST/) y posteriormente se refinaron manualmente. Además se usaron diversos programas de acceso libre para la traducción del ADN en proteínas (EXPASY), la predicción de secuencias (cbs.dtu.dk/services), el diseño de los clonajes (p-Draw) o la creación de los árboles filogenéticos (BioEdit).

5. CÉLULAS

5.1 Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este trabajo se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Líneas celulares.

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología
BHK-21	Hámster	Riñón	Fibroblástica
BSC-1	Mono verde africano	Riñón	Epitelial
Sf21	<i>Spodóptera frugiperda</i>	Ovario	Epitelial
Sp2	Ratón	Mieloma	Tumorales

5.2 Medios de cultivo

Las células BHK-21 se cultivaron en medio esencial mínimo de Glasgow GMEM (Gibco BRL) suplementado con un 10% de medio triptosa fosfato 29.5 g/l (Gibco BRL), 10 mM Hepes (BioWhittaker), 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker), 1 µg/ml de penicilina (BioWhittaker), 1 µg/ml de estreptomicina (BioWhittaker) y suero fetal bovino (SFB) al 5% (Lonza).

Las células BSC-1 se crecieron en medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco, EMEM, (BioWhittaker), suplementado con 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker), 1 µg/ml de penicilina (BioWhittaker), 1 µg/ml de estreptomicina (BioWhittaker) y SFB al 5%.

Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37° C en una atmósfera controlada de CO₂ al 5% y una humedad del 95%. En procesos de infección el SFB se redujo al 2%.

Las células de insecto Sf-21 se cultivaron en medio BD BaculoGold™ TNM-FH (BD-Biosciences) complementado con 0.1 mg/ml de gentamicina (Lonza) y, en ocasiones, con 2.5 µg/ml de anfotericina B (Lonza). Estas células se cultivaron a 27° C en ausencia de CO₂.

Las células Sp2 se cultivan en medio RPMI-1640 (BioWhittaker) complementado con 50 µg/ml de gentamicina (Lonza), 2 mM de L-Glutamina (BioWhittaker), 1 mM de Piruvato sódico (BioWhittaker) y 10% de SFB en el que se había inactivado el complemento por incubación a 56° C durante 30 min. Se cultivaron a 37° C en una atmósfera controlada de CO₂ al 5% y una humedad del 95%.

6. VIRUS

Los virus de insecto empleados en este trabajo, no generados en el mismo, fueron baculovirus recombinantes que expresaban proteínas irrelevantes usadas como controles negativos de los experimentos y que fueron cedidos por el Dr. J.M. Escribano.

De igual forma en el caso de los virus vaccinia se utilizó, por un lado, un virus vaccinia silvestre, Western Reserve (WR), empleado como control negativo de los procesos estudiados y por el otro, un virus vaccinia modificado, el V-RB12, que es un mutante de delección del gen F13L, que fueron amablemente cedidos por el Dr. R. Blasco.

6.1 Producción de virus recombinantes

6.1.1 Baculovirus

Los baculovirus recombinantes se generaron siguiendo las instrucciones del sistema comercial de Invitrogen, Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System. El sistema se basa en la transformación de células de *E.coli* DH10Bac[™], con los vectores pFastBac recombinantes generados que incluyen los insertos de interés. Estas células tienen la característica de poseer en su interior un genoma completo de baculovirus, un bácmido. En este bácmido existen secuencias mini-attTn7 de unión del transposón Tn7, presente en el vector pFastBac, como describimos con anterioridad. Entre estas secuencias se incluye también un segmento que codifica para el péptido LacZ α , sin interrupción de su expresión, que complementa la delección de este gen del genoma de las bacterias y así les permite formar colonias azules en presencia de un sustrato adecuado, como por ejemplo X-gal, junto con un inductor adecuado, como el IPTG. También posee genes de resistencia a kanamicina. Además, contiene un plásmido cooperador (*helper*) que facilita la transposición de los transposones Tn7 que flanquean los insertos de interés en los vectores pFastBac recombinantes, dentro de la región de transposición mini-att7 del genoma del bácmido. De esta forma, se sustituye un casete por otro y se interrumpe la expresión del operón del gen LacZ α . Además, contiene genes de resistencia a tetraciclina. Todo ello permite la selección de los clones positivos por coloración blanca y resistencia a antibióticos.

Se transformaron unos 15 ng de cada plásmido recombinante, p-ORF2-BAC y p $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2-BAC con 100 μ l de bacterias DH10Bac[™]. Se mezclaron y se incubaron 30 min en hielo, se les dio un choque térmico por calor a 42° C durante 45 seg y, de nuevo, se

mantuvieron en hielo durante dos minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla se diluyó en 900 µl de medio SOC y se dejó 4 h en una incubadora con agitación a 225 r.p.m.

A continuación, se sembraron las bacterias en placas de LB-Agar con 50 µg/ml de kanamicina (Sigma), 7 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de tetraciclina (Boehringer Mannheim), a las que previamente se habían añadido 100 µg/ml de X-Gal (MBI-Fermentas) y 40 µg/ml de IPTG (MBI-Fermentas) con un asa de siembra y en condiciones estériles. Se sembraron diferentes diluciones con el fin de conseguir colonias aisladas y se dejaron 48 h a 37° C. Se llevó a cabo un aislamiento por zig-zag de algunas de las colonias blancas crecidas bajo las mismas condiciones de antibióticos y X-Gal e IPTG, y se dejaron 72 h a 37° C para asegurar la selección por color de los positivos. En cada placa se incluyó también una colonia azul como control de la actividad del X-Gal y de la funcionalidad del sustrato de la enzima y del inductor de la misma. Se seleccionaron colonias blancas aisladas que se crecieron en 5 ml de medio líquido de cultivo LB con kanamicina, gentamicina y tetraciclina. Se cultivaron en una incubadora a 37° C en agitación a 225 r.p.m. durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se diluyeron 800 µl de los cultivos crecidos en 400 ml del mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones.

El aislamiento de los bácmidos recombinantes se realizó por el método de lisis alcalina descrito con anterioridad (198). Tras la cuantificación de los bácmidos recombinantes mediante espectrofotometría (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Bonsai Technologies), se chequeó la presencia de los insertos en los bácmidos recombinantes mediante PCR usando 100 ng de ADN, el estuche comercial y los oligonucleótidos en él incluidos, los cuales flanquean la región de clonación, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se seleccionaron bácmidos recombinantes positivos que incluyeron cada una de las proteínas de interés, Bácmido-ORF2 y Bácmido- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y se almacenaron en alícuotas a -20° C para poder ser utilizados con posterioridad.

Para la obtención de los baculovirus recombinantes se transfectaron células de insecto Sf21 con los bácmidos recombinantes respectivos. Para ello se mezcló 1 µg de cada bácmido recombinante con 200 µl de medio Grace's (Invitrogen) y 6 µl de cellfectina (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 45 min. Pasado este tiempo se completó la mezcla con 800 µl de medio Grace's. Se transfectaron 9×10^5 células Sf21 en placas de 9 cm² (Nunc) con la mezcla anterior y se mantuvieron durante 5 h a 27° C. A continuación se retiró la mezcla de transfección y se completó con medio de células de insecto, manteniéndose en la incubadora 72 h. Pasado este tiempo se recogió el sobrenadante del

cultivo, se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min a 4° C, y se recogió el sobrenadante, el cual pasó a ser considerado como solución de almacenamiento (*stock*) del primer pase de los baculovirus, P1. Posteriormente se procedió a la amplificación de los baculovirus almacenados mediante dos rondas más de infección, P2 y P3, realizadas mediante sucesivas infecciones de 2×10^6 células Sf21 con 500 µl de cada pase de orden menor. Los baculovirus BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 se guardaron a 4° C. También se guardaron a -80° C alícuotas de cada solución de almacenamiento (*stock*).

6.1.2 Virus vaccinia

Para la generación de los virus vaccinia recombinantes se procedió a la infección-transfección de células BHK-21 con el virus vaccinia V-RB12 y los plásmidos recombinantes pRB-Myc-His-ORF2 y pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2.

La infección-transfección se realizó en placas de 9 cm² con una confluencia de células del 80-90%. Se infectó a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.05 ufp (unidades formadoras de placa) en medio libre de SFB y sin antibióticos. El virus se mantuvo 1 h y 20 min para su correcta absorción. Pasado este tiempo, se retiró el inóculo y se completó con medio al 2.5% de SFB y antibióticos. A continuación se añadió la mezcla de transfección previamente preparada. Como agente transfectante se utilizó FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfectaron 2 µg de plásmido recombinante que se mantuvo en cultivo durante 72 h a 37°C. Como control siempre se incluyó virus vaccinia no recombinante. Tras recoger el producto de la transfección, se llevaron a cabo tres rondas de plaqueo y aislamiento, o clonación, de los posibles recombinantes positivos. Para este fin se despegaron mediante rascado mecánico las células en monocapa y el material recogido se sometió a tres rondas de congelación-descongelación, intercalados con tres pulsos de sonicación de 15 seg cada uno a la máxima amplitud. Los productos procesados se guardaron a -80° C.

Posteriormente, se infectaron monocapas de células BSC-1 con diluciones de orden 10 del producto de la infección-transfección. Tras 1 h y 30 min de adsorción se retiró el inóculo, se lavó con medio sin SFB y se añadieron 3 ml de una mezcla al 50% de agarosa LMP al 2%, previamente autoclavada, y de medio MEM 2X (Gibco) suplementado con antibióticos y 2% de SFB. La infección se mantuvo 72 h a 37° C, tras lo cual se seleccionaron recombinantes positivos en base al tamaño (grande) de placa, producto de la recombinación del gen de la proteína F13L presente en los plásmidos pRB21 manipulados

con el virus V-RB12 que carece de él (23) y por comparación con el fenotipo del virus no recombinante, placa pequeña. Tras recolectarlos de la agarosa se les añadieron 500 µl de medio DMEM al 5% de SFB y se procedió a tres nuevas rondas de congelación y descongelación y sonicación. Finalmente se seleccionó un único aislado con el que se procedió a la siguiente ronda de selección por plaqueo. Los virus seleccionados se conservaron a -80° C. Este procedimiento se repitió varias veces con el fin de clonar un virus p37 + (placa grande) / GPT-, lo que indica que el fragmento clonado en el plásmido entre las secuencias de recombinación se ha incorporado al virus sustituyendo el gen de la GPT que tenía el virus parental.

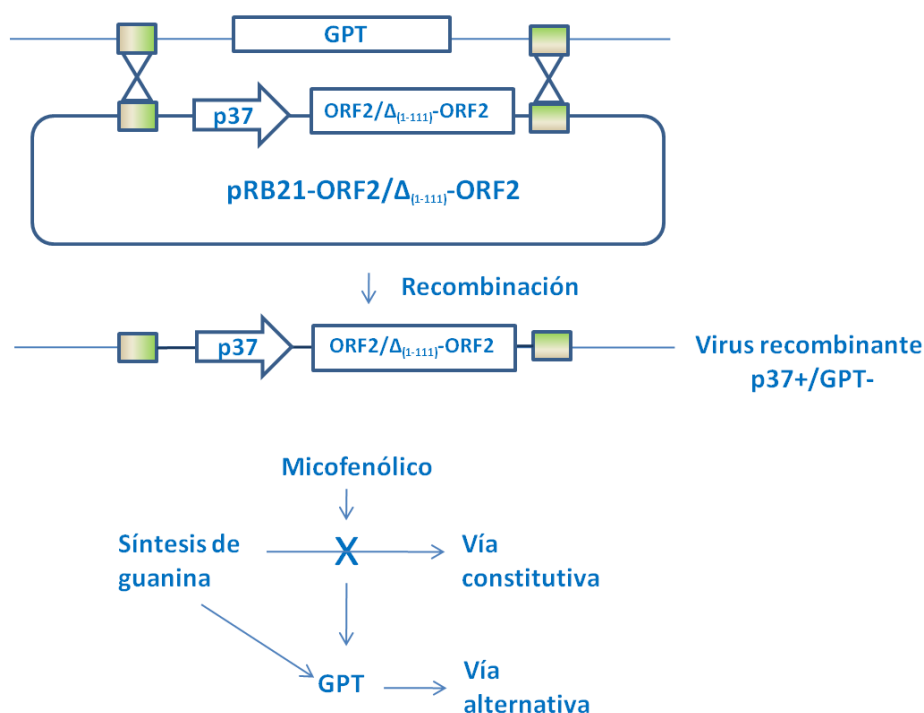


Figura 4. Esquema de la vía de selección de los virus vaccinia dobles recombinantes.

Posteriormente se llevó a cabo la comprobación de que se había clonado el fenotipo de virus esperado mediante el ensayo de la GPT y la prueba del ácido micofenólico (23). En este procedimiento el virus GPT- no crece en presencia de ácido micofenólico. En el medio selectivo de ácido micofenólico se incluye hipoxantina y xantina, sustrato de la enzima GPT, lo que permitirá el crecimiento de los virus recombinantes GPT+ (Figura 4).

Una vez se seleccionaron los dobles recombinantes, éstos se crecieron en células BSC-1 para incrementar su título y generar soluciones (*stocks*) de virus adecuados, VV-ORF2 y VV-Δ₍₁₋₁₁₁₎-ORF2, que se almacenaron a -80° C para ser usados con posterioridad.

6.2 Titulación de virus

Los baculovirus se titularon en células Sf21. Las titulaciones se llevaron a cabo infectando 1.2×10^6 células/pocillo con diluciones seriadas de virus. Se permitió la adsorción del virus durante 1 hora para después retirar el inóculo y se añadió 1.5 ml de agarosa LMP y medio de cultivo de células de insecto con antibiótico, en proporción 1:1, en las condiciones descritas anteriormente. Se protegió el cultivo de la luz y se dejó 8 días a 27° C en la incubadora. Finalizado este periodo se procedió a la tinción de las placas generadas añadiendo 1,5 ml/pocillo de rojo neutro (Sigma) diluido con PBS 1x filtrado (1:9), al que se permitió actuar durante un mínimo de 2 h en la incubadora a 27°C. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y se protegió de la luz, manteniéndolo a 4°C toda la noche. Al día siguiente se procedió al conteo de las placas producidas tras la infección viral.

Los virus vaccinia se titularon en células BSC-1 con una confluencia del 80%. Se hicieron diluciones seriadas del virus. El inóculo se mantuvo durante 1 h 30 min en medio de cultivo sin SFB y con antibióticos. Pasado este tiempo se retiró el inóculo y se lavó con medio sin SFB y con antibióticos y se añadieron 3 ml de una mezcla al 50% de agarosa LMP al 2% y de medio MEM 2x suplementado con antibióticos y 2% de SFB. Se dejó 72 h a 37° C tras lo que, las placas se fijaron durante 1 h con formaldehído al 10% (Panreac). Se retiraron la agarosa y el formaldehído y se tiñó con una solución de 3 g/l de cristal violeta (Sigma), 4% de formaldehído (Panreac) y 50% de etanol absoluto (Merck) durante un mínimo de 1 h. Finalmente, se retiró el exceso de colorante, se lavó con H₂O destilada, se dejó secar y se procedió al conteo de las placas generadas por la infección viral.

6.3 Purificación de virus vaccinia

Los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y el virus usado como control, WR, se centrifugaron, primero a través de un colchón de sacarosa, y posteriormente se purificaron en gradientes de sacarosa. Para este fin se infectaron monocapas de células BSC-1 sembradas en frascos de 450 cm² al 80% de confluencia. La infección se dejó progresar hasta que la monocapa estuvo totalmente arrasada. Se centrifugó el producto de la infección a 2500 r.p.m. durante 10 min y se disgregó el sedimento en 10 ml de 10 mM Tris HCl, pH 9. Los núcleos celulares se rompieron mecánicamente con un homogenizador y se centrifugaron de nuevo a 1500 r.p.m. durante 10 min para retirar los restos nucleares y obtener el virus intracelular. El sobrenadante se

sometió a 3-4 pulsos de sonicación recorriendo todas las longitudes de onda y se centrifugó a través de un colchón de sacarosa al 32% a 18000 r.p.m. durante 1 h 30 min a 4° C en una ultracentrífuga (Optima™ L-90K Ultracentrifuge Beckman Coulter). El sedimento se disolvió en 1 ml de 1 mM de Tris HCl y se cargó en un gradiente de sacarosa que se sometió a centrifugación a 14000 r.p.m. durante 50 min a 4° C. Se recogió la fracción que contenía el virus, apreciable a simple vista como una banda ligeramente blanca y después de lavar con 1 mM Tris HCl pH 9 y centrifugar de nuevo a 15000 r.p.m. durante 50 min, se disgregó en 1 mM Tris HCl pH 9. El virus purificado se guardó a -80°C.

7. PROTEÍNAS

7.2 Obtención de proteínas recombinantes en células

a) Células de insecto Sf21

Para la obtención en células de insecto Sf21 de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, se infectaron monocapas de células al 70-80% de confluencia con diferentes MDI, según los requerimientos, con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, respectivamente. La extracción de estas proteínas se llevó a cabo recogiendo el sobrenadante de cultivo junto con la monocapa celular, previamente raspada con rascador (IWAKI), y centrifugando el conjunto a 1200 r.p.m. durante 5 min a 4° C. El sobrenadante se guardó a 4° C para su posterior uso y el sedimento celular se disolvió en 50 μ l/1x10⁶ células de tampón RIPA (150 mM de NaCl, 5 mM de β - Mercaptoetanol (Bio Rad), 1% de NP40 (Fluka), 0.1% de SDS (Serva) y 50 mM de Tris-HCl pH 8) con inhibidores de proteasas, 1x Complete (ROCHE) y se dejó en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 20 min a 4° C y se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20° C hasta su utilización. Se siguieron los mismos procedimientos con el control negativo, células de Sf21 de insecto infectadas con un baculovirus irrelevante.

b) Células de mamífero BSC-1 y BHK-21

Las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv generadas en células BSC-1 y BHK-1 se obtuvieron tras la infección a diferentes MDI, según los requerimientos, de monocapas de células al 80% de confluencia con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, respectivamente. Se recogió el

sobrenadante de cultivo y la monocapa celular raspando con un rascador y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se disgregó en 2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de células con tampón de lisis-NP40 (1% de NP40, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA) e inhibidores de proteasas 1x. Se dejó 30 min a 4° C agitando con vortex cada 5 min. Se sometió a 3 pulsos de sonicación de 10 seg y amplitud máxima y se centrifugó 2 min a 13000 r.p.m. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se guardó a -20°C hasta su utilización. El mismo procedimiento se utilizó para procesar el control negativo, células de mamífero infectadas con el virus vaccinia silvestre WR.

7.2 Obtención de proteínas recombinantes en larvas de insecto

Las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r obtenidas de larvas de insecto de *Trichoplusia ni* infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, se obtuvieron tras la inoculación de las larvas siguiendo protocolos descritos con anterioridad (18, 176). De forma resumida, las larvas criadas en condiciones de seguridad de nivel 2 se sedaron y se mantuvieron en hielo durante 15 min. A continuación, se inocularon con los baculovirus recombinantes cerca del propodio (pie abdominal de las larvas) y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 28° C hasta el momento óptimo de recolección, en el cual se congelaron a -80° C hasta ser procesadas.

El procesamiento de las larvas se llevó a cabo siguiendo protocolos ya descritos (18, 176) mediante la trituración de las larvas en una batidora (Waring Commercial, Laboratory Blender) junto con un tampón de extracción consistente en PBS 1x, 1% de tritón X100 (Sigma), inhibidores de proteasas 1x y 25 mM de DTT (AppliChem). Se usaron 2 ml de tampón por larva. Para la obtención de los extractos crudos se procesaron habitualmente 10 larvas. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 15 min a 4° C en ultracentrífuga (Avanti TM J-25I Centrifuge, Beckman Coulter) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro miracloth (WNR), centrifugándose de nuevo a 10000 r.p.m. durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se filtró de nuevo y se guardó en alícuotas a -20° C hasta su utilización. Se siguió el mismo procedimiento para el control negativo, larvas infectadas con un baculovirus irrelevante.

7.2.1 Cinética de la expresión de las proteínas recombinantes en células de insecto

Se llevó a cabo una cinética de la expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en células de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes, BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, con el fin de establecer el momento óptimo de su expresión. Se infectaron monocapas celulares al 50% de confluencia y baja MDI (0.5 ufp/célula) que se fueron recolectando desde día 1 a 8 post-infección.

7.3 Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, expresadas en larvas de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 se purificaron parcialmente. Aprovechando la cola de His se usaron columnas de afinidad His gravitrap (HealthCare) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El sistema permite la purificación de las proteínas bajo condiciones nativas, con imidazol (Merck) y se basa en la unión de iones de Ni^{2+} a una resina y en la afinidad de estos iones por los residuos de His, bajo determinadas condiciones de pH. Se purificaron las proteínas producidas por 16 larvas infectadas con los baculovirus recombinantes que se procesaron de forma similar a los extractos crudos de larvas, variando la composición del tampón de extracción que, en este caso, fue una solución de unión 10 mM de imidazol, que contiene 10 mM de imidazol, 1x de inhibidores de proteasas, 1.5% de tritón X100, 3 mM de DTT y 1x de tampón fosfato 8x (79.77 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80.44 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck y 4 M de NaCl, pH 7.4). Después de la primera centrifugación se incluyó un paso de sonicación de tres pulsos de 10 seg y amplitud de 80V. Antes de pasar la muestra por las columnas, éstas se equilibraron con 10 ml de solución de lavado 10 mM de imidazol (en tampón fosfato 1x). Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados consecutivos con solución de lavado 10 mM y 20 mM de imidazol (en tampón fosfato 1x) y, por último, las proteínas se eluyeron con una solución de imidazol 500 mM (en tampón fosfato 1x y 1x de inhibidores de proteasas). Se siguieron los mismos procedimientos con el control negativo, correspondiente a larvas de insecto infectadas con un baculovirus irrelevante.

7.4 Electroforesis de proteínas

Las proteínas se preparan con tampón de ruptura desnaturizante 1x [(62.5 mM de Tris HCl pH 6.8, 2% de SDS, 0,1 M de β -Mercaptoetanol, 40% de glicerol y 0.05 mg de azul de bromofenol (Sigma)]. Antes de cargarlas en el gel se desnaturalizaron a 100° C durante 5 min y se pasaron rápidamente a hielo para evitar la re-naturalización. Las

proteínas se resolvieron en condiciones desnaturalizantes usando geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS al 0.2% (SDS-PAGE) y a un amperaje de 30 mA por gel.

Para poder visualizar las proteínas los geles se tiñeron con Azul de Coomassie [0.25% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Biorad), 45% de metanol (Merck) y 10% de ácido acético (Merck)] retirando el exceso de colorante con una solución que contenía un 45% de metanol y un 10% de ácido acético.

7.5 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas se determinó por espectrofotometría empleando el método de Bradford (27) con el reactivo comercial BIO-RAD Protein Assay (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando como recta patrón una curva de seroalbúmina bovina, BSA (Sigma) de concentración conocida.

Cuando las proteínas a cuantificar eran visibles en geles de poliacrilamida SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomassie, también se determinó su concentración por densitometría usando de nuevo como patrón una curva de BSA de concentración conocida.

7.6 Ensayos de glicosilación de las proteínas recombinantes

Para determinar la posible glicosilación de las proteínas recombinantes expresadas en los distintos sistemas utilizados se usó la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación de las proteínas (53, 54, 218-220). Como control de la actividad de la tunicamicina se realizó el ensayo en el virus vaccinia silvestre WR, analizándose la glicosilación o ausencia de la misma, de la glicoproteína de expresión tardía B5 (58, 101). En el caso de baculovirus se usó un recombinante, el BacGmel (72), que expresa una glicoproteína unida a His.

Se infectaron células BSC-1 en pocillos de 9 cm² al 80% de confluencia con 2 ufp/célula de los vaccinias recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y el control WR. Se dejó 1 h de adsorción con medio sin SBF ni antibióticos. Se lavaron los pocillos y se completó con medio al 2%. Se añadió 1 µg/µl de tunicamicina (Sigma) a los pocillos en el momento de la infección y cuatro horas después. Como control, en algunos pocillos no se añadió tunicamicina. Se incluyó también un control de células sin infectar a las que se sometió a las mismas condiciones que las células infectadas. El experimento se realizó por duplicado, recogiendo la infección a las 7 y 17 horas post-infección (h.p.i.). Los restos celulares y el sobrenadante de cultivo se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 5 min a 4° C.

El precipitado se resuspendió en 100 µl de solución de ruptura desnaturalizante 1x y se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación y a tres pulsos de sonicación.

En el caso de los baculovirus recombinantes se infectaron monocapas de células Sf21 al 50% de confluencia con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y con el virus control de la glicosilación BacGmel a una MDI de 1 ufp/célula. Tras 1 h y 30 min se lavó y se dejó con medio de cultivo. Se añadió tunicamicina en ese momento o a las 24 ó 48 h.p.i. De nuevo, en algunos pocillos, no se añadió tunicamicina. Los cultivos se recogieron a los 3 días post-infección (d.p.i.).

8. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

8.1 Transferencia y *Western-Blot* (WB)

Las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Biorad) por transferencia electrónica durante 1 h y 30 min a 180 mA. Las membranas se bloquearon durante 1 h con leche semidesnatada (Nestlé) al 5% en PBS 1x-0.05% Tween (Biorad) y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en leche semidesnatada al 1% con PBS 1x-0.05% Tween. Los sueros policlonales de cerdo, de humano o de ratón se usaron a dilución 1:100, el anticuerpo monoclonal α - His (Clontech) se usó a 1:7500, el anticuerpo monoclonal α -B5 (cedido por el Dr. Rafael Blasco) a 1:75. Después de lavar las membranas con PBS 1x-0.05% Tween (dos lavados de 15 min) se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa correspondientes, diluidos en leche semidesnatada al 1% en PBS1x-0.05% Tween durante 1 h. Las diluciones de los anticuerpos secundarios usados fueron: HRP anti-mouse IgG (Sigma) a 1:4000, HRP anti-porcine IgG (AbD Serotec) 1:30000 y HRP anti-human IgG (AbD Serotec) 1:10000. De nuevo, las membranas se sometieron a 4 lavados de 15 min con PBS 1x-0.05% Tween. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación. A continuación, las membranas se revelaron durante 1 min con ECL, 1:1 solución A y B (A: 2.5 mM de luminol (Sigma), 0.4 mM de ácido p-cumárico (Sigma), 100 mM de Tris-HCl pH 8.5; B: 100 mM de Tris-HCl pH 8.5, 0.018 % de H₂O₂) y exposición con películas fotográficas X-Ray film (Agfa).

8.2 Ensayo inmunoenzimático

a) ELISA indirecto

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (Nunc) que se tapizaron con 50 μ l/pocillo de antígeno diluido en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6 (1.59 g/l de Na_2CO_3 (Merck), 2.93 g/l de NaHCO_3 (Merck), y H_2O destilada) y se incubaron toda la noche a 4° C. Se bloquearon los pocillos con 100 μ l/pocillo de leche semidesnatada al 3% en PBS 1x-0.05% Tween durante 1 h a 37° C. Se añadieron 50 μ l/pocillo de los sueros que se querían testar diluidos 1:100 en solución de bloqueo. En todos los casos se incluyó antígeno negativo en la dilución de los anticuerpos primarios en la misma concentración con la que se había tapizado el pocillo de ELISA anteriormente. Se incubaron los sueros durante 1 h a 37° C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 1x-0.05% Tween y se añadieron 50 μ l/pocillo de la dilución del anticuerpo secundario, diluido en solución de bloqueo, y se incubaron 1 h a 37° C. Las diluciones de los anticuerpos secundarios empleadas fueron: HRP anti-ratón IgG (Sigma) a 1:3000, HRP anti-cerdo IgG (AbD Serotec) 1:30000 y HRP anti-humano IgG (AbD Serotec) 1:10000. Por último, se lavaron las placas 3 veces con PBS 1x-0.05% Tween, manteniendo el último lavado durante 5 min. A continuación se reveló el ELISA añadiendo 50 μ l/pocillo de solución ortofenilendiamina, OPD (Sigma), junto con 0.056% de H_2O_2 . Se dejó la reacción durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad antes de pararla con la adición de 50 μ l/pocillo de solución 3N de H_2SO_4 (Merck). Se determinó la absorbancia en un lector de microplacas (TecanGENios) utilizando un filtro de 492 nm de longitud de onda. Todas las muestras a testar se incluyeron por duplicado.

Cuando se utilizó el estuche comercial MP Diagnostic Kit (GENELABS) se siguieron las instrucciones de los fabricantes y sus criterios a la hora del establecimiento de la positividad o negatividad de las muestras. Como este ensayo está desarrollado para sueros humanos, cuando se utilizó con los sueros porcinos se emplearon como controles negativos y positivos los sueros caracterizados descritos anteriormente y como anticuerpo secundario se utilizó HRP anti-cerdo IgG (AbD Serotec) a dilución 1:500. El resto de los procedimientos se mantuvieron siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

b) ELISA de competición

El ELISA de competición se empleó para determinar si los anticuerpos monoclonales (AcMo) generados en esta tesis, 4G11 y 2F8 (ver apartado 11 de Materiales

y métodos), estaban dirigidos contra el mismo epítipo o contra epítipos distintos. Todos los tiempos de incubación y materiales empleados en el ELISA directo se mantuvieron en este ensayo, que consistió en tapizar los pocillos de ELISA con cada uno de los anticuerpos monoclonales a testar desde una dilución saturante a dilución límite. Después de la fase de bloqueo se añadió el anticuerpo competidor marcado con biotina, que en el caso del 4G11 se usó a dilución 1:1600, y en el caso de 2F8 a dilución 1:200. Por último, como sustrato, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa, Streptavidine-HRP (Invitrogen), a dilución 1:1500.

8.3 Inmunofluorescencia indirecta

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, en células de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes Bac-ORF2 y Bac- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, y en células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas recombinantes fusionadas a GFP, p-GFP-ORF2 y p-GFP- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2. En todos los casos se incluyeron células infectadas o transfectadas con los correspondientes controles negativos.

Se crecieron células BSC-1 y BHK-21 al 80% de confluencia en cubreobjetos de vidrio y se infectaron con MDI variables de 0.5 -1 ufp/célula. Las células se fijaron a 7 y 17 h.p.i., respectivamente. En el caso de los baculovirus recombinantes, se infectaron monocapas de células de insecto Sf21 al 80% de confluencia con MDI de 1 ufp/célula y se fijaron a las 72 h.p.i. En los ensayos de las proteínas recombinantes fusionadas a GFP, se transfectaron células BHK-21 con los plásmidos correspondientes bajo las mismas condiciones de transfección empleadas en la producción de los virus vaccinia recombinantes. En este caso las células se fijaron a las 24 horas post-transfección.

Las células se fijaron con metanol o con paraformaldehído 4%, PFA 4% (Merck). En el caso de las células fijadas con metanol, éstas se incubaron a -20° C durante 10 min con metanol 100% (previamente refrigerado a -20° C), a continuación se lavaron dos veces con PBS 1x y se incubaron con los correspondientes anticuerpos. Las células a fijar con paraformaldehído, se incubaron con PFA 4% añadido en frío durante 12 min. A continuación se lavaron dos veces con PBS 1x y en el caso de las permeabilizadas, se incubaron durante 15 min con PBS 1x-0,1% de TritónX-100. A continuación se lavaron con PBS 1x. Tanto las células previamente permeabilizadas con Tritón como las no permeabilizadas, se incubaron durante 5 min con PBS 1x-0.1 M de glicina (Merck). Por

último, se realizó un nuevo lavado con PBS 1x y se procedió a la incubación con los correspondientes anticuerpos.

Todas las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios, así como las de los fluorocromos, se llevan a cabo en PBS 1x-20% de SFB. Las incubaciones con los anticuerpos primarios fueron de 45 min, lavando después la preparación con PBS 1x y la de los secundarios durante 30 min, lavando después la preparación dos veces con PBS 1x y una vez con H₂O destilada para retirar posibles restos de cristales salinos. A continuación, se procedió al montaje de las preparaciones con FluorSave Reagent (Calbiochem). En algunas ocasiones se realizó una tinción del ADN con Hoescht (Invitrogen) En estos casos se añadió 30 min antes de parar la infección.

Los anticuerpos y fluoróforos empleados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón Anti-C-Myc, a dilución 1:200 (Roche), anticuerpo policlonal de conejo anti-calnexina a dilución 1:100 (Stressgen), anticuerpo policlonal de conejo anti-calreticulina a dilución 1:200 (Abcam), lectina del germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin*-Alexa Fluor-594, WGA) a dilución 1:300 (Invitrogen), suero policlonal de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor-488 ó 594 a dilución 1:500, suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor- 488 ó 594 a dilución 1:400, suero policlonal de burro anti-IgG de rata Alexa Fluor-594 a dilución 1:400 (Invitrogen), anticuerpo monoclonal de ratón anti-B5 (a dilución 1:100) y sobrenadantes de cultivo de los AcMo 4G11 y 2F8 a dilución 1:150, o los AcMo conjugados con Alexa Fluor-488 a dilución 1:300 generados en este trabajo.

9. MICROSCOPIA ÓPTICA

9.1 Microscopía de fluorescencia convencional

La observación de las muestras se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia Nikon, con un objetivo de 60x. Las fotografías de las células se adquirieron con una cámara Retiga Q-imaging. Las imágenes se procesaron usando el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

9.2 Microscopía de fluorescencia confocal

La observación de las preparaciones se llevó a cabo usando un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS SPE usando un objetivo de 63x. Las imágenes se

adquirieron empleando la aplicación Leica Application Suite Advanced fluorescence software (LAS AF).

10. EXPERIMENTOS IN VIVO

La experimentación con animales se llevó a cabo siguiendo la legislación vigente y en particular de acuerdo al Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, que versa sobre la protección de los animales destinados a la experimentación y a otros fines científicos y fueron previamente aprobados por los Comités de nuestra institución. Los experimentos se llevaron a cabo en los animalarios de nuestra institución.

10.1 Ensayos de inmunización con el modelo murino

La validación de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, parcialmente purificadas de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y de los vaccinias recombinantes purificados VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 como inmunógenos se llevó a cabo en ratonas Swiss de 8 semanas de edad. Todas las inoculaciones se realizan intraperitonealmente y los ratones se sangraron de la mácula facial antes de las inmunizaciones a diferentes días post-inoculación, dpi. La producción de anticuerpos específicos se determinó mediante ELISA utilizando los sueros de los animales. Estos fueron anestesiados con halotano (Sigma) y sacrificados por dislocación cervical al final del experimento. Cuando se utilizó adyuvante, éste fue el de Freund (Sigma). Como control se incluyeron grupos de ratones inoculados con recombinantes irrelevantes o sin inocular.

10.2 Estudio de la transmisión intrauterina y por lactancia de los anticuerpos desarrollados

Para el estudio de la posible transmisión de anticuerpos de madres inmunizadas a sus crías y de las rutas de dicha transmisión se preñaron ratonas Swiss (blancas) inmunizadas. Al mismo tiempo se preñaron ratonas B6D2 (negras) sin inmunizar. En el momento del parto se intercambiaron aproximadamente la mitad de las camadas entre las ratonas inmunizadas y las no inmunizadas. En algún caso, crías procedentes de madres no inmunizadas se intercambiaron a 9 días post-parto (d.p.p.) para estudiar la transmisión de los anticuerpos a través de la leche, evitando de este modo la posible transmisión por calostro. Las crías de una u otra procedencia se diferenciaron por el color de su pelo. Se

sacrificaron crías a distintos d.p.p. y se extrajo sangre para los análisis inmunoenzimáticos. Además, para poder asegurar que se producía transmisión intrauterina de anticuerpos, en 5 hembras previamente anestesiadas se realizaron cesáreas sacrificando los fetos en el momento en que se extrajeron de la placenta.

11. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

En colaboración con la Dra. Belén Borrego (CISA) se generaron anticuerpos monoclonales frente a las proteínas recombinantes generadas. Para este fin se inocularon ratonas Swiss con 100 µg de proteína recombinante $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificada de larvas infectadas administrada con adyuvante de Freund completo en la primera inmunización e incompleto en las inmunizaciones sucesivas. Los animales se sangraron a 15 y 22 d.p.i. para testar por ELISA la presencia de anticuerpos específicos en el suero. Antes de llevar a cabo la extracción de los linfocitos del bazo de los animales, se les dio una dosis de recuerdo para provocar la reorganización de las células linfocitarias al bazo. A los 3 días de la dosis de recuerdo se sacrificaron los animales, previamente anestesiados, y se les extrajo el bazo en condiciones estériles, para proceder a la obtención de los linfocitos del mismo y a su posterior fusión con células de mieloma Sp2. El protocolo se basó en los descritos con anterioridad para la generación de anticuerpos monoclonales (1, 122).

11.1. Análisis del isotipo de los AcMo

Se llevó a cabo un análisis del isotipo de los AcMo de los sobrenadantes de cultivo usando el estuche comercial Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (BD Biosciences Pharmigen) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

11.2. Purificación de los AcMo

Los AcMo se purificaron por columnas de afinidad con proteína G utilizando G-Sepharosa 4 Fast Flow (GE Healthcare). La resina se lavó con PBS 1x (en proporción 1:10) en agitación a 4° C, realizándose, al menos, dos lavados. Posteriormente, se empaquetó la resina lavada en la columna. El sobrenadante de cultivo de los AcMo se mezcló con un volumen equivalente de tampón de unión (20 mM de fosfato sódico pH 7) y se pasó por la columna. A continuación se lavó la columna con 50 ml de tampón de unión y se procedió a eluir los AcMo retenidos en la columna añadiendo 15 ml de tampón de elución (0.1M de glicina-HCl pH 2.7), y recogiendo unas 10 fracciones de aproximadamente 1,5 ml (en tubos en los que previamente se había añadido 300 µl de

solución neutralizante (1M de Tris-HCl pH 9). La lectura del rendimiento de la purificación se llevó a cabo por espectrofotometría.

11.3. Marcaje con biotina de los AcMo

Para poder llevar a cabo los ensayos de competición en ELISA de los AcMo y establecer si éstos estaban dirigidos o no contra el mismo epítipo antigénico, se procedió a su marcaje con biotina. Para ello se dializaron los AcMo purificados frente a 0.1 M de bicarbonato sódico, pH 8.3, ajustando la concentración final a 1 mg/ml. Posteriormente, se añadió 125 µg de una solución de N-hidroxi-succinimida-biotina (Sigma) diluida en DMSO por cada mg de la solución de AcMo dializada, incubando la mezcla en agitación durante 4 h a temperatura ambiente. Finalmente, se volvió a dializar los AcMo-biotinilados frente a una solución de PBS 1x antes de proceder a comprobar el correcto marcaje por ELISA.

11.4. Marcaje con Alexa Fluor-488 de los AcMo

El marcaje de los AcMo con el fluorocromo Alexa Fluor-488 para su uso en inmunofluorescencia se realizó mediante el estuche comercial Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit, Molecular ProbesTM (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Las comparaciones estadísticas entre los grupos de datos se realizaron utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson para variables categóricas mediante el programa GraphPad. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA (ORF2) DEL VHE EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

El primer objetivo de esta tesis consistió en la obtención de formas recombinantes de la proteína de la cápsida, ORF2, del VHE de genotipo III, que es la proteína más inmunogénica del virus. Con este fin, las proteínas se expresaron y caracterizaron tras la infección de células y larvas de insecto con baculovirus recombinantes, así como de células de mamífero con virus vaccinia recombinantes.

1.1 El sistema de baculovirus

Se generaron dos baculovirus recombinantes, uno que expresa la proteína ORF2 completa del VHE de genotipo III y otro que expresa una forma truncada de esta proteína que carece de los primeros 111 aminoácidos ($\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r). Esta forma truncada aparece de forma espontánea al expresar la proteína ORF2 completa en algunos sistemas celulares de insecto (136, 191, 262) y tiene la capacidad de formar VLPs (135, 136), mimetizando, probablemente, el resultado del procesamiento de la proteína de la cápsida del VHE durante el transcurso de las infecciones naturales.

1.1.1 Obtención de los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r

Tal y como se describe en Materiales y métodos, la proteína ORF2r completa se obtuvo por RT-PCR a partir del ARN vírico extraído de una muestra de heces perteneciente a un cerdo infectado de forma natural con el VHE. Tanto ORF2r completa como $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r se clonaron en el vector de baculovirus pFastBacMel2 al que se añadió una cola de 6 Histidinas (His) para facilitar su reconocimiento y purificación (Figura 5). De este modo se obtuvieron los baculovirus recombinantes correspondientes, BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2.

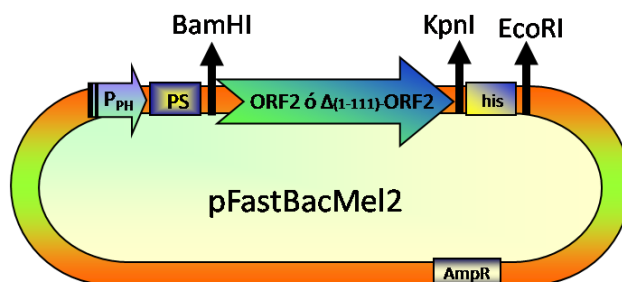


Figura 5. Esquema del vector de baculovirus pFastBacMel2 empleado en la generación de los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2. **P_{PH}**: promotor de polihedrina, **PS**: péptido señal de la melitina, **His**: fragmento correspondiente a 6 histidinas, **Amp**: gen de resistencia a la ampicilina. **BamHI**, **KpnI** y **EcoRI** indican los sitios de reconocimiento de dichas enzimas de restricción utilizadas para la clonación de los fragmentos génicos del ORF2 del VHE.

1.1.2 Expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células de insecto

La correcta expresión de las proteínas recombinantes ORF2r completa y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r se ensayó en células Sf21 de insecto tras la infección con los correspondientes baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 (Figura 6). Como control se utilizó un extracto de células Sf21 infectadas con un baculovirus recombinante irrelevante.

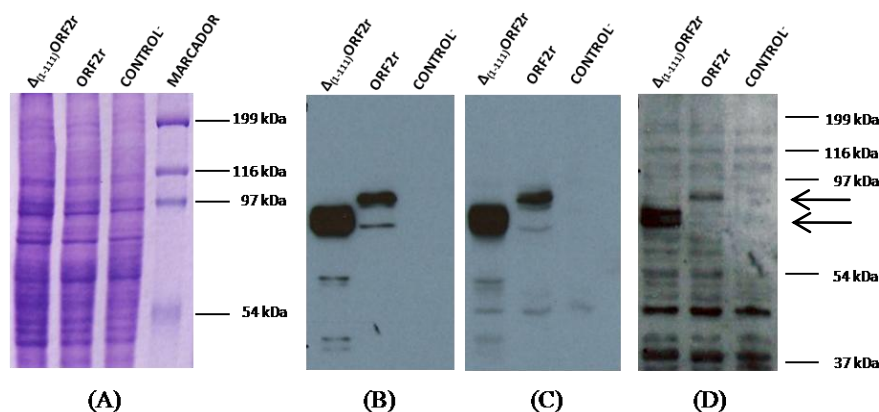


Figura 6. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células Sf21 de insecto: **A**, SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. **B**, **C** y **D**, Western Blot revelados con un anticuerpo monoclonal anti-His (dilución 1:7500), un suero porcino (dilución 1:100) y uno humano (dilución 1:100) positivos para el VHE, respectivamente. Las flechas señalan la posición de las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en el lateral de los geles.

La cantidad de proteínas recombinantes expresadas no fue suficiente como para distinguirlas en geles de poliácridamida teñidos con azul de Coomassie (Figura 6A).

Cuando se llevaron a cabo análisis mediante WB se observó que la proteína ORF2r completa aparecía como una especie proteica mayoritaria con un tamaño aparente de alrededor de 78 kDa, junto con alguna especie minoritaria de menor tamaño de alrededor de 65-68 kDa. Este patrón era distinguible tanto cuando se utilizaba anticuerpo monoclonal anti-His (Figura 6B), como cuando se usaban sueros porcinos (Figura 6C) o humanos (Figura 6D) positivos para el VHE.

Análisis similares realizados con la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r muestran un doblete con un tamaño aproximado de 65-68 kDa (Figuras 6B, C y D) similar al detectado en las bandas de menor masa apreciables cuando se expresa la proteína ORF2r entera. En ocasiones, dependiendo del transcurso de la infección, del estado del cultivo celular y del rendimiento de la extracción de las proteínas, el doblete aparece como una serie de bandas cuyas masas varían entre 62 y 70 kDa.

En las condiciones utilizadas, la expresión de $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r siempre fue mayor que la de la forma completa. En algunas ocasiones (Figura 6B y D) además se observaron bandas de alrededor de 50 kDa, que probablemente corresponden a intermedios de maduración o a productos de degradación originados durante el proceso de extracción.

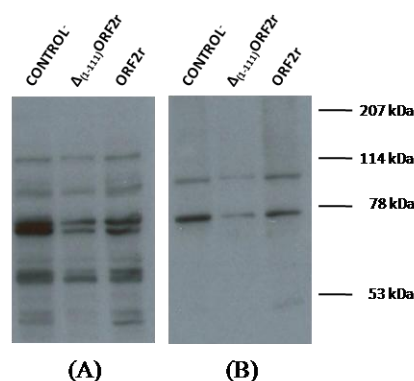


Figura 7. Análisis de la especificidad de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en células Sf21 de insecto. A y B, WB revelados con un suero porcino (dilución 1:100) y uno humano (dilución 1:100) negativos para el VHE, respectivamente. CONTROL⁻, control negativo de células infectadas con un baculovirus recombinante irrelevante. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

La especificidad de los productos detectados se confirmó mediante análisis similares revelados con sueros porcinos (Figura 7A) y humanos (Figura 7B) negativos para el VHE, que no reconocen ninguna especie proteica específica distinguible de las inespecíficas presentes en los controles negativos.

1.1.3 Estudio de la cinética de expresión de las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células de insecto

a. ORF2r

Con el fin de establecer el momento óptimo de expresión de ORF2r en células Sf21 se infectaron monocapas celulares con BAC-ORF2 a baja multiplicidad de infección (0.5 ufp/célula) y se procesaron a diferentes d.p.i. (1 a 8) tal y como se indica en materiales y métodos. Como controles se incluyeron monocapas de células no infectadas procesadas de igual modo. El análisis de la expresión de las proteínas se llevó a cabo mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 8A) y WB (Figura 8B, y C).

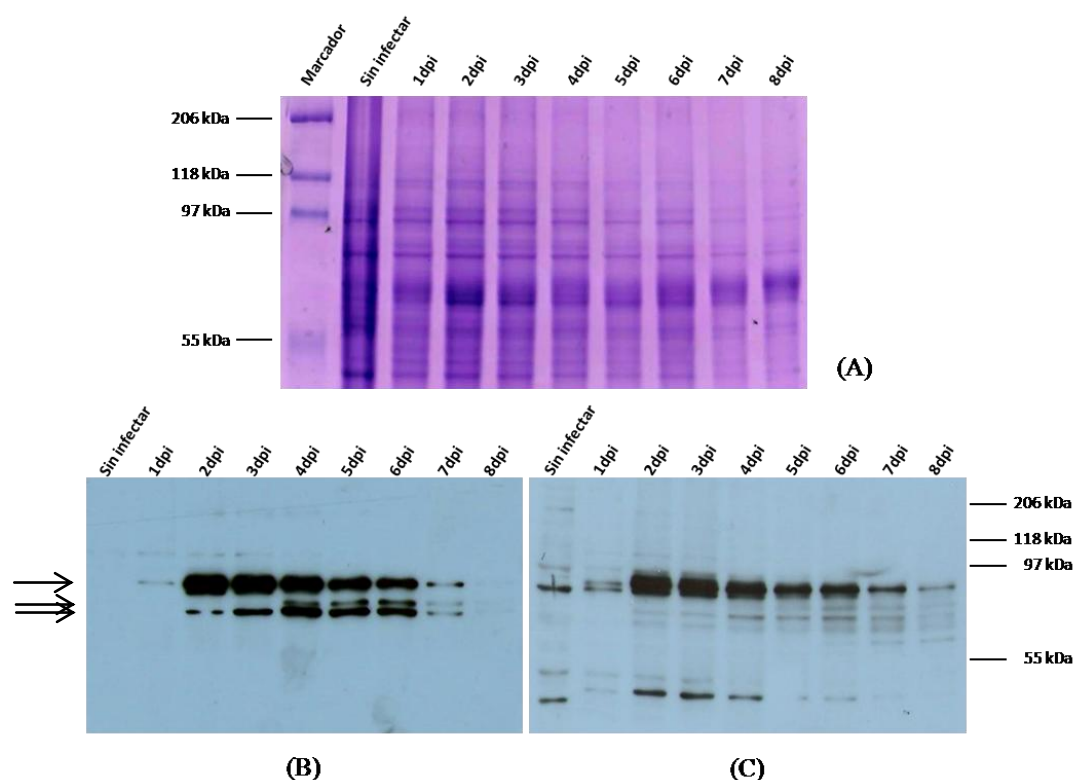


Figura 8. Cinética de expresión de la proteína recombinante ORF2r en células de insecto Sf21. A, SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, **B** y **C**, WB revelados con un anticuerpo monoclonal anti-His (dilución 1:7500) y un suero porcino positivo para el VHE (dilución 1:100), respectivamente. Las células sin infectar se usan como control y corresponden a una monocapa de células recolectadas 5 d.p.i. de los controles positivos. Las flechas señalan la posición de las proteínas específicas expresadas. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

Se observó que la proteína ORF2r completa comienza a expresarse desde el 1^{er} d.p.i., alcanzando su máximo nivel entre el 2^o y el 4^o d.p.i. (Figura 8B y C). A partir del 5^o d.p.i. la producción de la proteína disminuye probablemente debido a la degradación y

muerte celular (Figura 8A). La especie mayoritaria de 78 kDa es visible a partir del 1^{er} d.p.i. La banda de 65 kDa comienza a ser visible desde el 2^o d.p.i., mientras que la de 68 kDa sólo es visible a partir del 3^{er} d.p.i.

b. $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r

El análisis de la cinética de expresión de la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, realizado en las mismas condiciones expuestas en el apartado anterior, mostró que, al igual que la forma completa, la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r comienza a expresarse también, aunque a muy bajo nivel, a partir del 1^{er} d.p.i. Su expresión aumenta desde el 2^o d.p.i., manteniéndose constante hasta el sexto día, momento en el que, como en el caso anterior, la expresión comienza a disminuir (Figura 9).

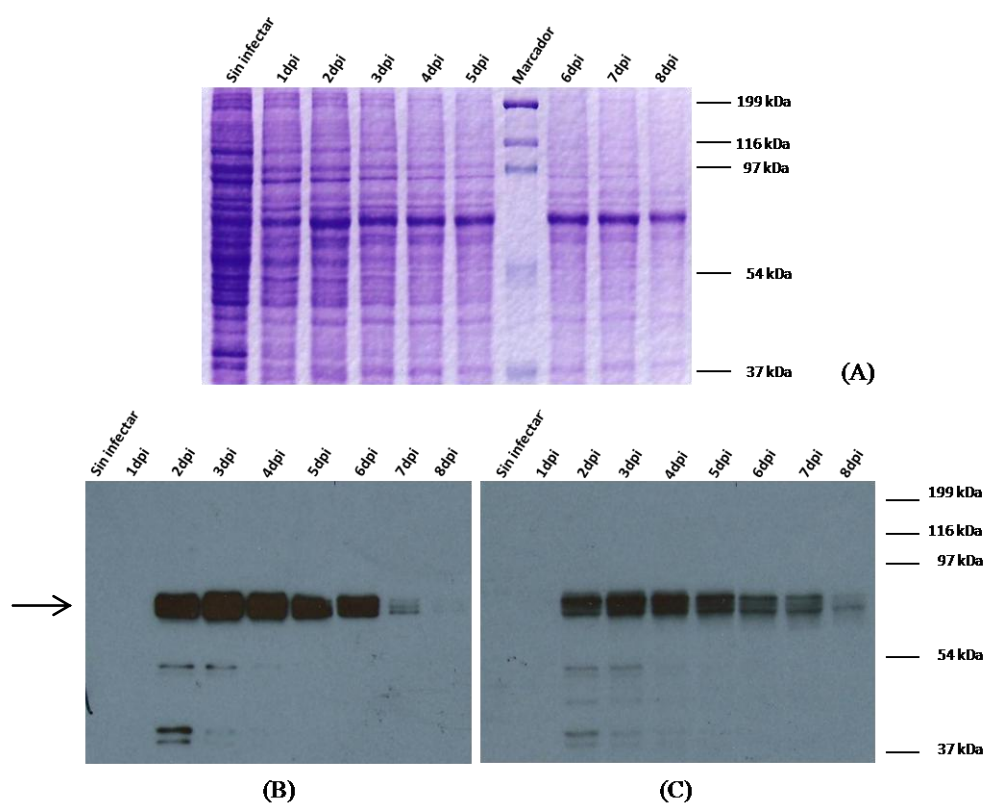


Figura 9. Cinética de expresión de la proteína recombinante $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en células de insecto Sf21. A, SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, B y C, WB revelados con un anticuerpo monoclonal anti-His (dilución 1:7500) y un suero porcino positivo para el VHE (dilución 1:100), respectivamente. Las células sin infectar se usan como control y corresponden a una monocapa de células no infectadas recolectada 5 d.p.i. de los controles positivos. Las flechas señalan la posición de las proteínas específicas expresadas. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

1.1.4 Estudio de la glicosilación de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en células de insecto

Con objeto de analizar algunos procesos post-traduccionales en el sistema de baculovirus se llevó a cabo un estudio de la glicosilación de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en células de insecto Sf21 infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2. Para ello se empleó tunicamicina, un inhibidor de la enzima N-acetilglicosamina fosfotransferasa (53, 54, 218-220), en las condiciones descritas en materiales y métodos. Los extractos celulares se recogieron a las 72 h.p.i. y se analizaron por WB (Figura 10). Como control de la acción de la tunicamicina se empleó un baculovirus recombinante, BacgEr, que expresa una proteína glicosilada (72).

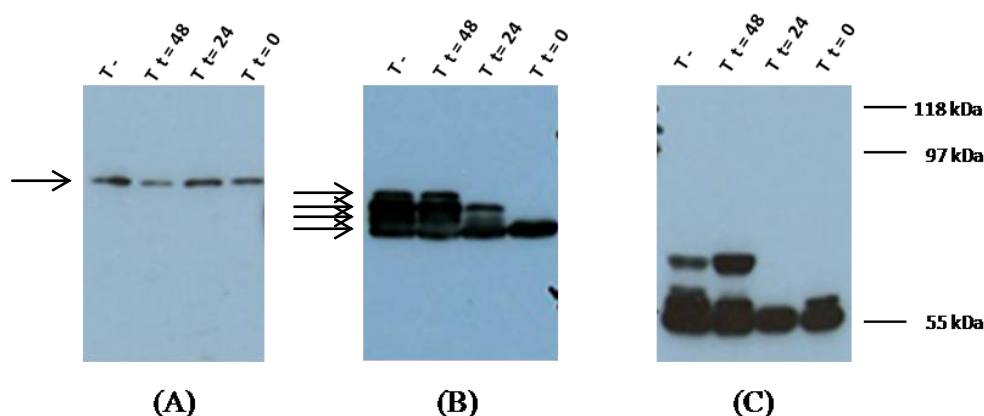


Figura 10. Análisis por WB de la N-glicosilación de las proteínas ORF2r (A), $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r (B) y BacgEr (C) expresadas en células de insecto. Los geles se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti-His a dilución 1:7500, en ausencia (T -) o presencia, a diferentes tiempos p.i. (0h, 24h y 48h), de tunicamicina. Las flechas señalan la posición de ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r a los distintos tiempos ensayados. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

La movilidad de la proteína ORF2r expresada en células de insecto no varía en presencia o ausencia del inhibidor de la N-glicosilación (Figura 10A), lo que sugiere que ORF2r no sufre procesos de N-glicosilación en las condiciones de ensayo empleadas. Por el contrario, la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en ausencia del inhibidor, o cuando éste se administra 48 h.p.i., aparece como 4 especies proteicas de distinta movilidad electroforética, de 62-70 kDa (Figura 10B). La administración de tunicamicina 24 h.p.i. hace que la especie de mayor masa molecular no sea detectable, mientras que si el

inhibidor se administra desde el comienzo de la infección, tras la hora de adsorción, únicamente la banda de menor tamaño es visible. Así pues, bajo las condiciones ensayadas, la forma truncada de la proteína de la cápsida expresada en células de insecto presenta hasta 3 isoformas distintas que potencialmente pueden sufrir procesos de N-glicosilación.

1.1.5 Expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en larvas de insecto

Con el fin de mejorar la producción de proteínas recombinantes y reducir sus costes, se procedió a realizar ensayos como los descritos anteriormente utilizando como sistema de expresión larvas de insecto de *Trichoplusia ni* infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 y procesadas a las 72 h.p.i., tal y como se describe en materiales y métodos.

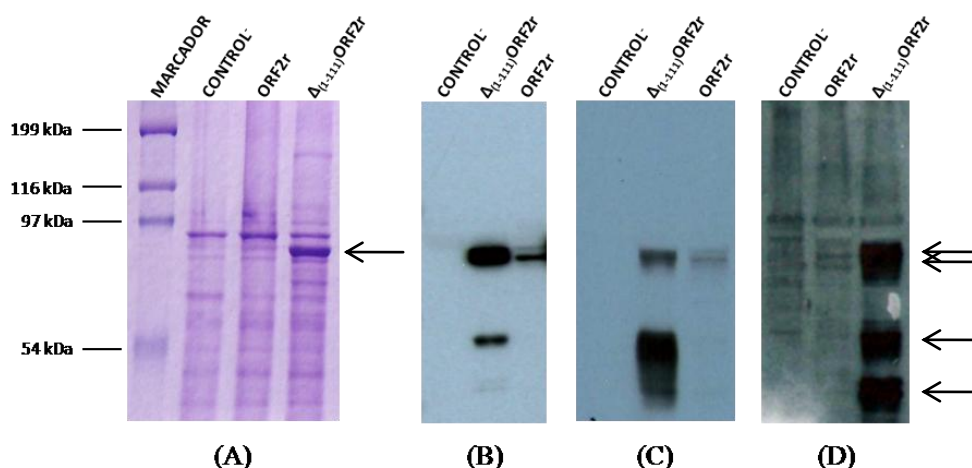


Figura 11. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en larvas de insecto de *T. ni*. A, SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B, C y D, Western Blot revelados con un anticuerpo monoclonal anti-His (dilución 1:7500), un suero porcino (dilución 1:100) y uno humano (dilución 1:100) positivos para el VHE, respectivamente. CONTROL-, control negativo de larvas infectadas con un baculovirus recombinante irrelevante. Las flechas señalan la posición de las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

Tal y como se observa en la figura 11, tras la tinción con azul de Coomassie, la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r es claramente visible, mientras que, al igual que ocurría con los extractos de células Sf21 infectadas, ORF2r no se expresa en cantidades suficientes como para ser detectable (Figura 11A). Por otra parte y al contrario de lo que ocurría en células infectadas, el patrón de expresión en las larvas de ambas proteínas recombinantes,

ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, es indistinguible, un doblete de 65-68 kDa (Figura 11B, C y D), similar al de la forma truncada y a las especies minoritarias de la forma completa expresadas en células de insecto (Figura 6). Los mismos patrones se observaron cuando el análisis se realizó tanto con un anticuerpo anti-His, como con sueros porcinos o humanos positivos para el VHE.

De nuevo, la especificidad de los productos detectados se confirmó mediante análisis similares revelados con sueros porcinos (Figura 12A) y humanos (Figura 12B) negativos para el VHE, que no reconocen ninguna especie proteica específica distinguible de las inespecíficas presentes en los controles negativos.

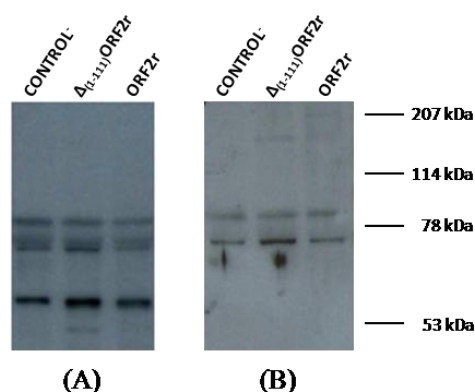


Figura 12. Análisis de la especificidad de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en larvas de insectos. A y B, WB revelados con un suero porcino (dilución 1:100) y uno humano (dilución 1:100) negativos para el VHE, respectivamente. CONTROL-, control negativo de células infectas con un baculovirus recombinante irrelevante. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

1.1.6 Purificación de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r producidas en larvas de insecto

Las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en larvas de insecto se purificaron por columnas de afinidad, tal y como se describe en materiales y métodos. El mismo ensayo se realizó con un control negativo correspondiente a larvas infectadas con un baculovirus irrelevante.

El rendimiento de la purificación se analizó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 13). La presencia de bandas inespecíficas, presentes también en los controles negativos, indicaba que la purificación no fue todo lo eficaz que se esperaba,

aunque suficiente para llevar a cabo los experimentos programados con ellas. Por otra parte, el rendimiento de la purificación de la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, (Figura 13B) siempre fue mucho mayor que el de la proteína ORF2r (Figura 13A).

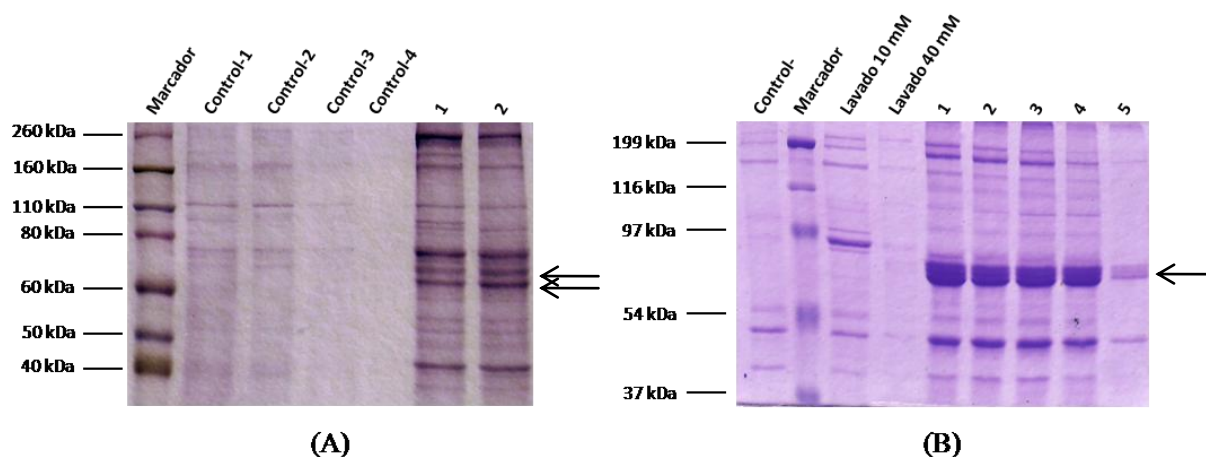


Figura 13. Rendimiento de la purificación parcial de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de la purificación parcial de las proteínas recombinantes producidas en larvas de insecto. **(A)** Proteína ORF2r. Los carriles Control-(1-4) son diferentes fracciones del control negativo, extractos de larvas infectadas con un baculovirus irrelevante y sometidas al mismo proceso de purificación. Los carriles 1 y 2 son fracciones de la proteína específica. **(B)** Proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. Los carriles 1-5 corresponden a diferentes fracciones de la proteína específica. Las flechas señalan la posición de las proteínas específicas. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles

Las proteínas parcialmente purificadas se cuantificaron por el método de Bradford y por densitometría en SDS-PAGE con patrones de concentración conocida de seroalbúmina bovina. Un cálculo aproximado permitió estimar que, dependiendo del rendimiento del proceso, las cantidades de proteínas obtenidas fueron de 100-200 $\mu\text{g/larva}$ para ORF2r y de 200-350 $\mu\text{g/larva}$ para $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r.

Para confirmar la especificidad de las proteínas recombinantes del VHE parcialmente purificadas, éstas se analizaron mediante WB (Figura 14) utilizando como control extractos crudos de larvas infectadas con un baculovirus irrelevante purificados bajo las mismas condiciones.

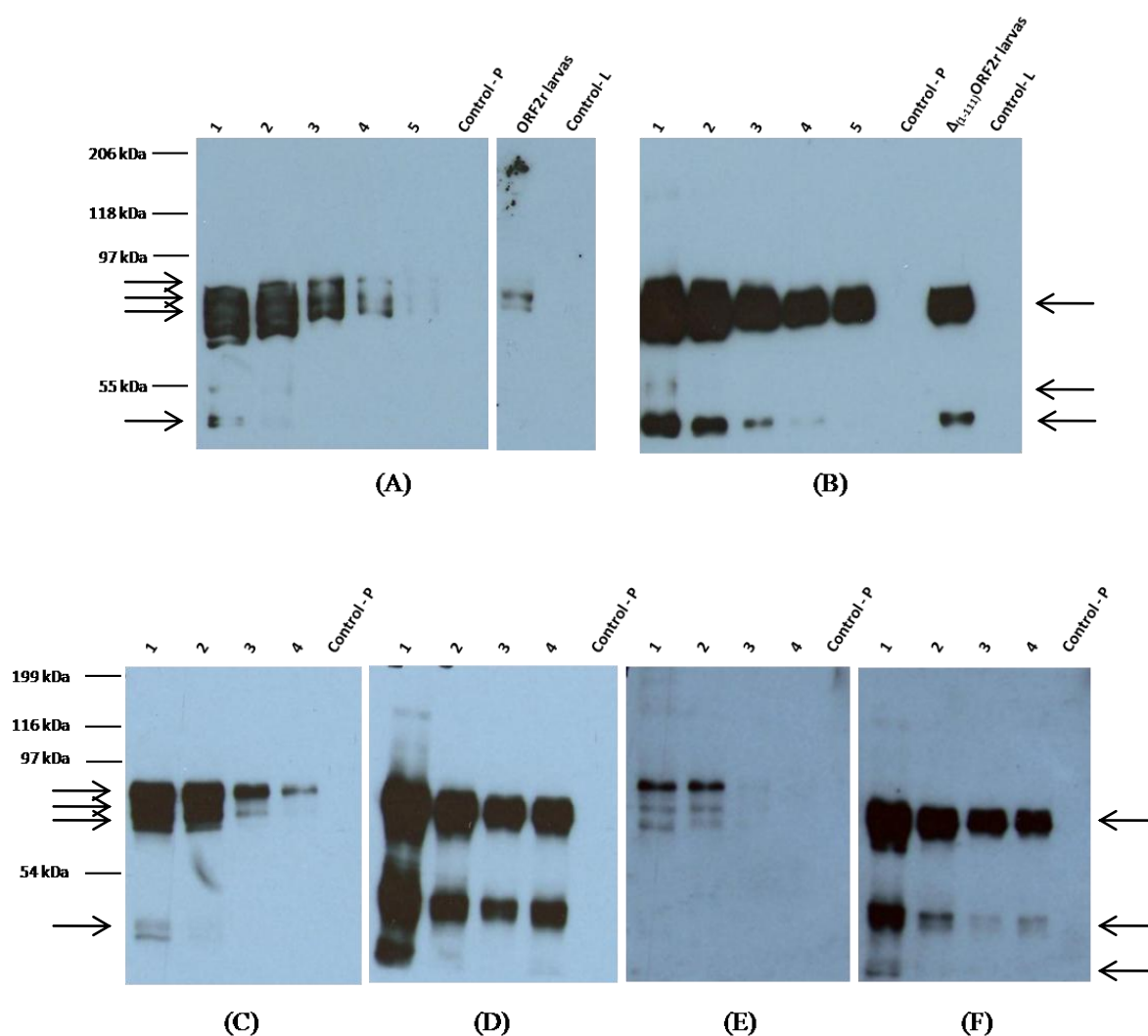


Figura 14. Purificación parcial de las proteínas recombinantes producidas en larvas de insecto. Análisis por WB de la proteína ORF2r parcialmente purificada (A, C y E) y de la proteína $\Delta(1-111)$ -ORF2r parcialmente purificada (B, D y F) revelado con un anticuerpo anti-His (a dilución 1:7500) (A y B) y con sueros de cerdo (a dilución 1:100) (C y D) y humano (a dilución 1:100) (E y F) positivos para el VHE. Los números de los carriles indican diferentes fracciones de la purificación. Los controles corresponden a extractos crudos de larvas infectadas con un baculovirus irrelevante purificados (Control-P) o sin purificar (Control- L). Las flechas señalan la posición de las proteínas específicas. En algunos casos se incluyen también los extractos crudos de larvas sin purificar. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles

1.2 El sistema de vaccinia

En paralelo a los estudios realizados con el sistema de baculovirus se llevaron a cabo análisis similares utilizando el sistema de vaccinia para la obtención de virus vaccinia recombinantes que expresasen las dos formas de ORF2 del VHE objeto de este estudio.

1.2.1 Obtención de los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2

Con el fin de obtener dos virus vaccinia recombinantes, VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, las dos formas de ORF2 obtenidas mediante RT-PCR, tal y como se describe en materiales y métodos, se clonaron en el vector de vaccinia pRB21 (22), en el que se incluyó un epítipo Myc y una cola de 6 His (Figura 15) para, de nuevo, facilitar su reconocimiento y purificación.

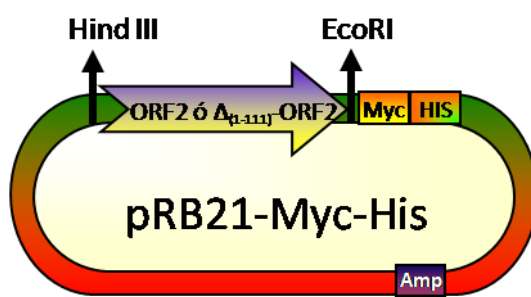


Figura 15. Esquema del vector pRB21 del virus vaccinia empleado en la generación de los plásmidos recombinantes pRB-Myc-His-ORF2 y pRB-Myc-His- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2. **Myc:** fragmento génico que codifica un epítipo Myc, **His:** fragmento génico que codifica 6 histidinas, **Amp:** gen de resistencia a ampicilina. **HindIII** y **EcoRI**, indican los sitios de reconocimiento de dichas enzimas de restricción utilizadas para la clonación de los fragmentos génicos del ORF2 del VHE.

1.2.2 Expresión de las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv en células de mamífero

Al igual que se hizo con el sistema de baculovirus, se estudio la correcta expresión de las proteínas recombinantes ORF2r-vv completa y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv a partir de la infección con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 (Figura 16). Las infecciones se llevaron a cabo en células BHK-21 y BSC-1. Como control se utilizó un extracto de células infectadas con un virus vaccinia silvestre, WR. La expresión de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv se analizó tanto en el sobrenadante como en el precipitado celular.

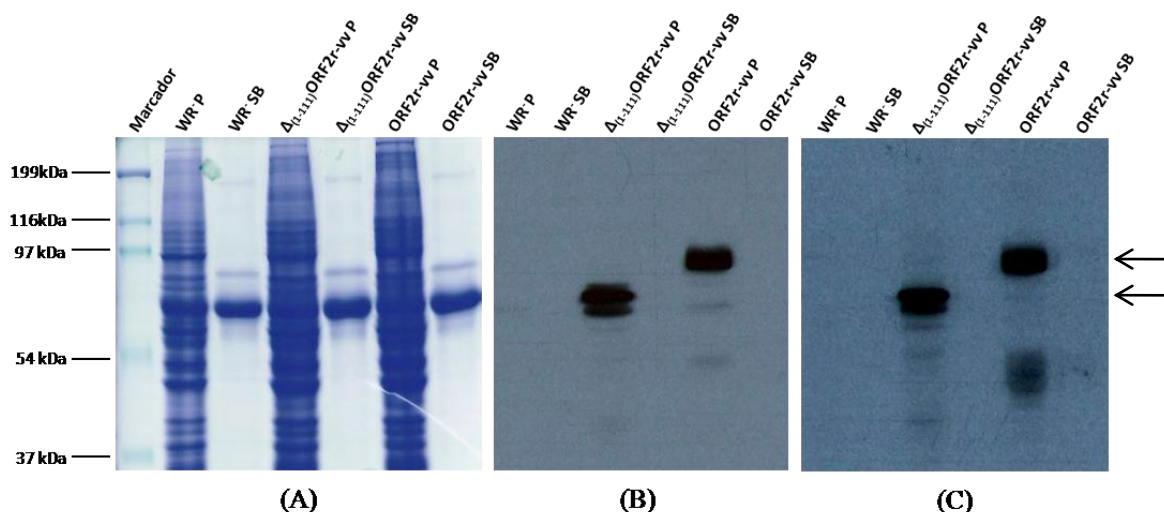


Figura 16. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv en células de mamífero BHK-21. (A), SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. (B), y (C), Western Blot revelados con un anticuerpo monoclonal anti-His (dilución 1:7500), un suero porcino (dilución 1:100) positivos para el VHE, respectivamente. WR control negativo de células infectas con un virus vaccinia silvestre. Las flechas señalan la posición de las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv, P y SB corresponden al precipitado y al sobrenadante celular, respectivamente. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

Como en el caso de la infección de células de insecto Sf21 con los baculovirus recombinantes, el análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie no permitió la visualización ni de ORF2r-vv ni $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv, ni en los extractos de precipitado celular, ni en los sobrenadante de cultivo de células BHK-21 infectadas con los virus vaccinia correspondientes (Figura 16A).

Cuando los análisis se realizaron mediante WB (Figura 16B y C) las proteínas recombinantes sólo fueron distinguibles en los precipitados celulares, pero no en los sobrenadantes de cultivo, probablemente por encontrarse diluidas en el mismo. Como se puede apreciar (Figura 16B y C), la proteína recombinante ORF2r-vv aparece, dependiendo de las condiciones de infección, procesamiento y exposición, como una serie de especies proteicas de unos 80 a 90 kDa. Por su parte, la proteína recombinante $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv aparece como un doblete de unos 60-62 kDa. Este patrón se observó tanto cuando el WB se reveló con un anticuerpo anti-His, como con un suero porcino positivo para el VHE. Resultados similares se obtuvieron cuando las infecciones se llevaron a cabo en células BSC-1 (resultados no mostrados).

1.2.3 Estudio de la glicosilación de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv en células de mamífero

Dada la distinta capacidad de glicosilación que presenta la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto o de mamífero se procedió a analizar también los patrones de N-glicosilación de las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv expresadas en células de mamífero infectadas con los vaccinias recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 empleando de nuevo la tunicamicina como inhibidor de la N-glicosilación (Figura 17). En este caso, como control de la correcta acción de la tunicamicina se analizó la inhibición de la N-glicosilación de una glicoproteína de expresión tardía del virus vaccinia, la B5 (58, 101).

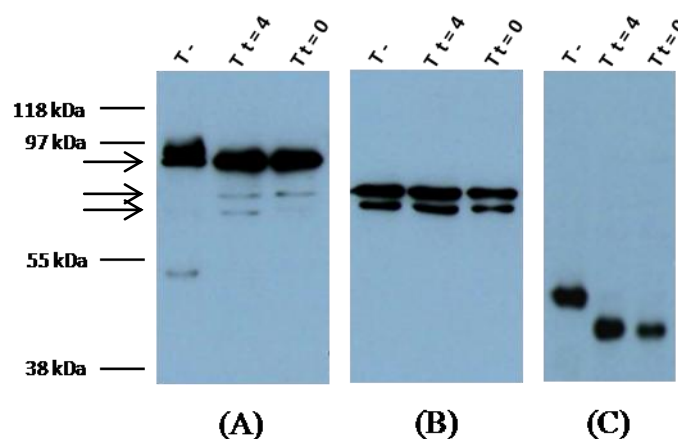


Figura 17. Análisis por WB de la N-glicosilación de las proteínas ORF2r-vv, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r y B5 expresadas en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia correspondientes. Los geles se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti-His a dilución 1:7500 (A y B) y con un anticuerpo anti-B5 a dilución 1:75 (C), en ausencia (T-) o presencia, a diferentes tiempos post-infección (0h, y 4h), de tunicamicina. Las células se procesaron a 7 h.p.i. Las flechas señalan la posición de ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r a los distintos tiempos ensayados. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra en los laterales de los geles.

Como se observa en la figura 17, el control del ensayo confirmó la acción inhibitoria de la N-glicosilación de la tunicamicina, ya que no se detectó la forma glicosilada de la glicoproteína B5 en presencia del inhibidor.

La proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv presenta el mismo patrón, un doblete de unos 60-62 kDa, en presencia y ausencia de tunicamicina, lo que sugiere que no está N-glicosilada en este sistema (Figura 17). Por su parte, en el análisis de la forma recombinante completa se

observaron diferencias en la movilidad de las especies proteicas como consecuencia de la presencia o ausencia de tunicamicina. Así, el conjunto de especies proteicas de mayor tamaño desapareció, tanto cuando el inhibidor se añadió a tiempo 0, como a las 4 h.p.i., observándose una única especie de menor tamaño. Por otro lado, las formas intermedias de 62-65 kDa, que aparecen cuando se expresa la forma completa de ORF2 son prácticamente inapreciables en ausencia de tunicamicina y claramente visibles cuando ésta está presente (Figura 17).

1.2.4 Estudio de la localización celular de las proteínas recombinantes en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes

El estudio de la expresión y localización celular de ambas proteínas en células de mamífero se llevó a cabo en células BSC-1 y BHK-21 infectadas con los virus vaccinia recombinantes a una MDI de 1 ó 0.5 ufp/célula y fijadas a 7 ó 17 h.p.i., respectivamente. Dependiendo también de los orgánulos a visualizar y/o los anticuerpos empleados, las células se fijaron con PFA 4%, o con Metanol absoluto, tal y como se describe en materiales y métodos.

Como se muestra en la figura 18, ambas proteínas se localizan por todo el citoplasma celular, aunque el patrón de distribución que muestran es claramente distinto.

Dada la aparente acumulación yuxtannuclear de ambas proteínas en células permeabilizadas, más clara en el caso de ORF2r-vv y el patrón de distribución a lo largo de todo el citoplasma de la célula, se llevó a cabo un análisis mediante microscopía confocal para determinar la posible colocalización de ambas proteínas en el complejo de Golgi y/o en el retículo endoplasmático (RE).

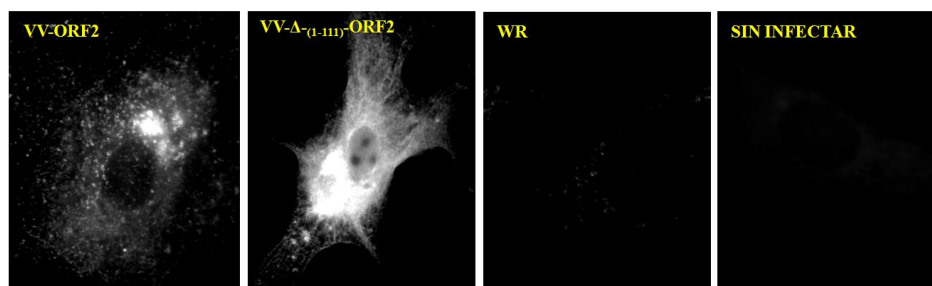


Figura 18. Localización celular de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv. Análisis de su expresión, mediante técnicas de inmunofluorescencia, en células BSC-1 infectadas con 0.5 ufp/célula con los virus vaccinia recombinantes, el control WR o sin infectar y recogidas a 17 h.p.i. Las células se fijaron con PFA 4% y se permeabilizaron. La inmunofluorescencia se llevó a cabo con un anticuerpo

monoclonal anti-C-Myc de ratón (a dilución 1:200) y con un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor-488 (a dilución 1:500).

Con el fin de analizar si el patrón perinuclear observado correspondía a una localización de las proteínas en Golgi se realizó un doble marcaje con anti-C-Myc y WGA, una lectina de trigo que marca específicamente el complejo de Golgi (169). Únicamente se observó una colocalización con el marcador de Golgi en el caso de la proteína ORF2-vv completa en células BSC-1 (Figura 19A). Esta proteína, además de concentrarse preferentemente en la zona del Golgi, también se localiza de forma más dispersa por el resto de la célula, de manera similar a como lo hace la forma truncada (Figura 19A y B). En ningún caso se detectó señal con el anticuerpo específico anti-C-Myc, empleado para el estudio de las formas recombinantes del VHE, en las células infectadas con el virus vaccinia control WR, o en las células sin infectar (Figura 19C y D). Resultados similares se obtuvieron utilizando células BHK-21 (ver Anexo I).

Para el estudio de la colocalización de ambas proteínas con el retículo endoplasmático se realizó un doble marcaje con anti-C-Myc y un anticuerpo dirigido contra una proteína de RE, la calnexina (Figura 20). Se observó que ambas proteínas colocalizan, al menos en parte, en células BHK-21 (Figura 20A y B). De nuevo, no se observó señal con anti-C-Myc en las células infectadas con el virus vaccinia control WR, ni en las células sin infectar (Figuras 20C y D). Resultados equiparables se obtuvieron en células BSC-1 (ver Anexo I), tanto con este marcador de RE, como cuando el marcador de retículo empleado fue la anti-calreticulina, anticuerpo dirigido contra la proteína de RE calreticulina (ver Anexo I).

Con el fin de investigar si la propia morfogénesis del virus vaccinia podía estar influyendo en la localización intracelular de las proteínas recombinantes, y de comprobar si la localización citoplasmática mostrada por ellas se correspondía con la del virus vaccinia, se realizó un doble marcaje con anti-C-Myc y Hoescht (marcador nuclear que emite fluorescencia cuando se une a ADN de doble cadena), el cual reconoce el genoma de ADN del virus vaccinia (Figura 21).

Como puede observarse en la figura 21, el patrón mostrado por el virus vaccinia no coincide con la distribución de las proteínas recombinantes analizadas.

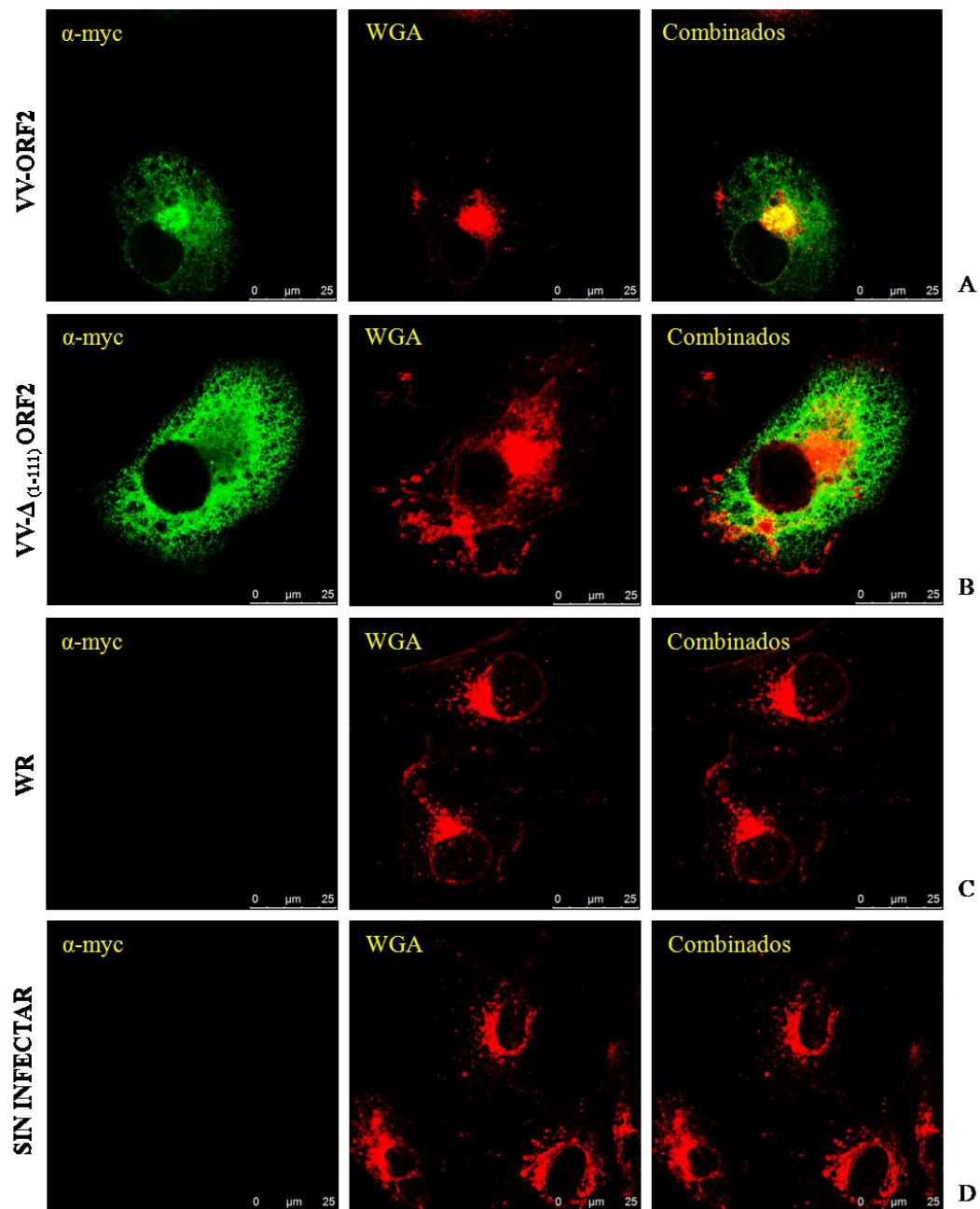


Figura 19. Inmunofluorescencia mediante doble marcaje con anti-C-Myc y WGA de células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes. Las células BSC-1 infectadas (MDI de 1 ufp/célula) con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 (A) y VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2 (B), virus vaccinia WR (C), o sin infectar (D), se fijaron a las 7 h.p.i. con Metanol absoluto y se incubaron primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C-Myc (a dilución 1:200), seguido de un anticuerpo anti-ratón AlexaFluor-488 (a dilución 1:500) y la lectina WGA conjugada a un fluorocromo Alexa Fluor-594 (a dilución 1:300).

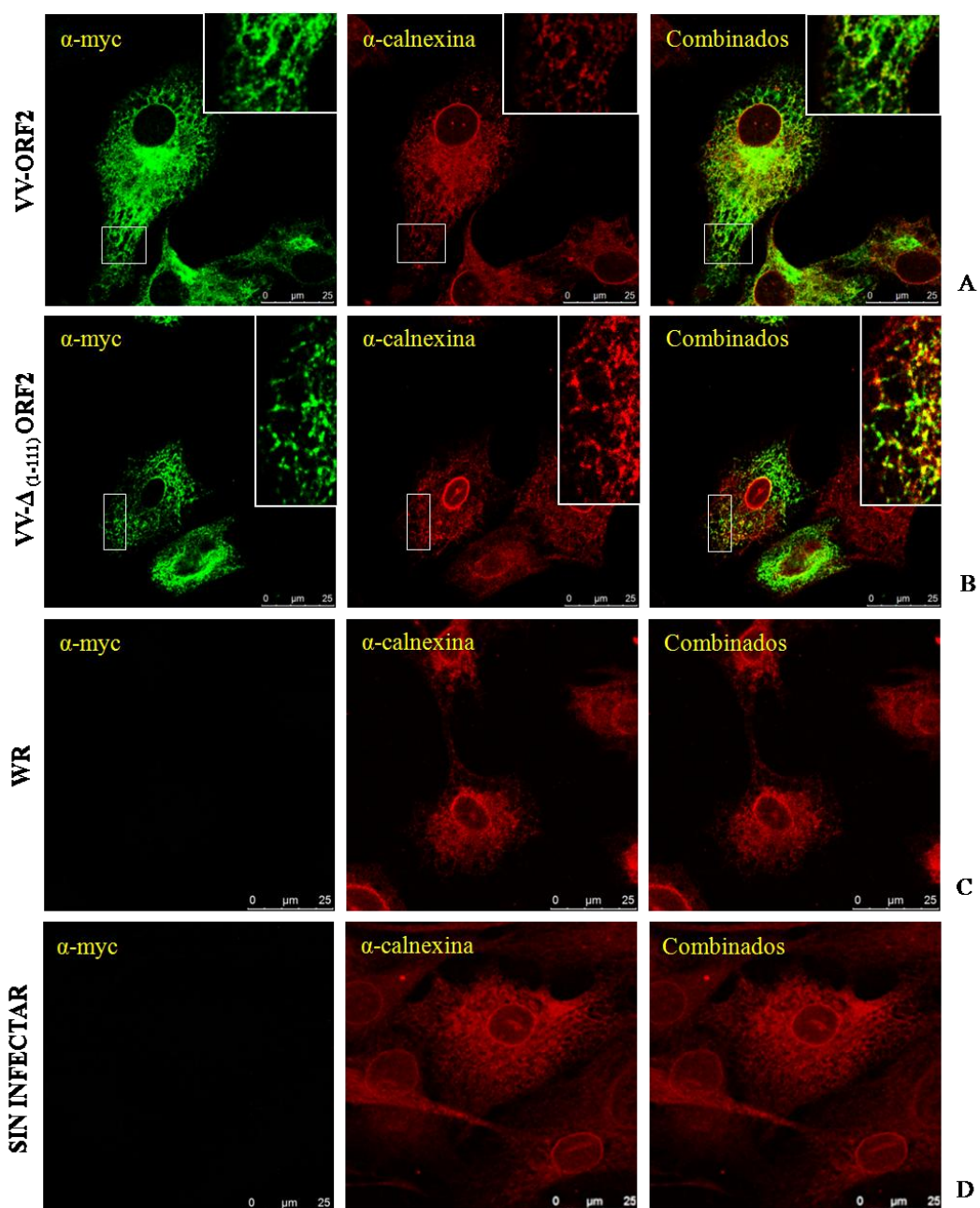


Figura 20. Inmunofluorescencia mediante doble marcaje con anti-C-Myc y anti-calnexina, de células BHK-21 infectadas con los virus vaccinia recombinantes. Las células BHK-21 infectadas (MDI de 1 ufp/célula) con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 (**A**) y VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2 (**B**), virus vaccinia WR (**C**), o sin infectar (**D**) se fijaron a las 7 h.p.i. con Metanol absoluto y se incubaron primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C-Myc (a dilución 1:200) y un anticuerpo monoclonal de conejo anti-calnexina (a dilución 1:100), seguido de un anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor-488 (a dilución 1:500) y un anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor-594 (a dilución 1:400). Los recuadros blancos reflejan zonas de la célula ampliadas para apreciar mejor la colocalización.

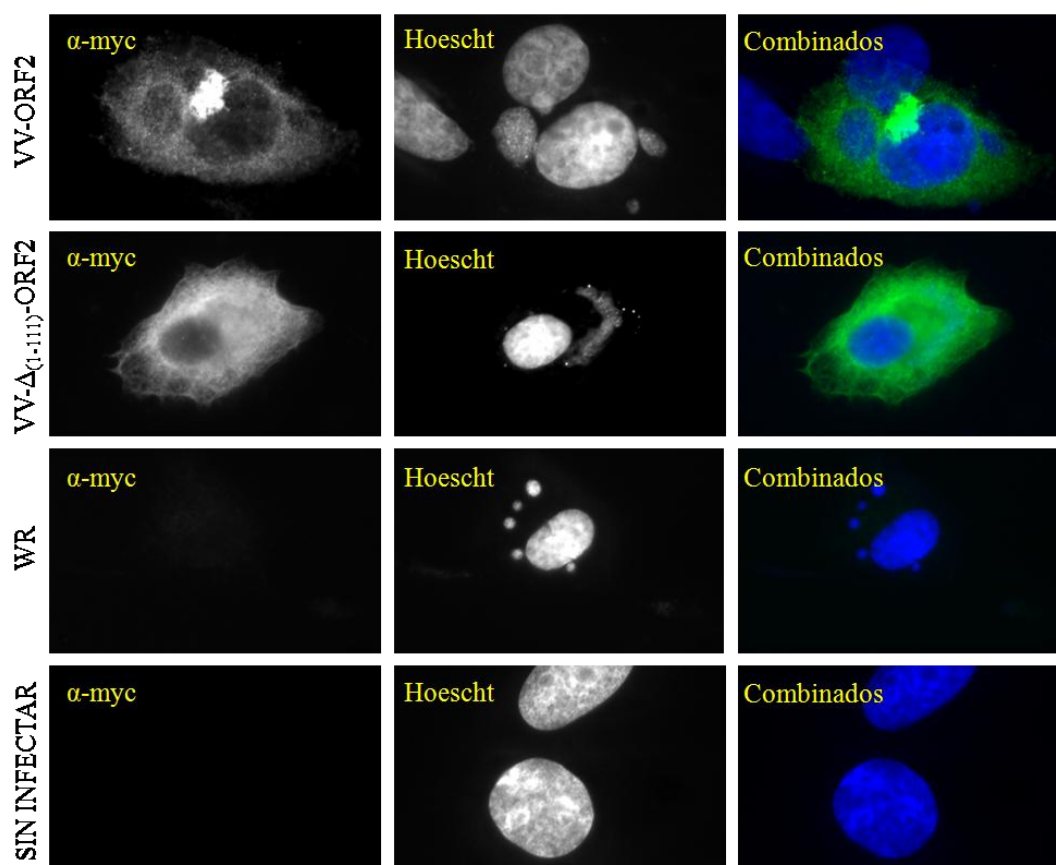


Figura 21. Análisis mediante inmunofluorescencia de la posible colocalización de las proteínas recombinantes del VHE con el virus vaccinia. Las células BSC-1 se fijaron con PFA 4% y permeabilizaron a las 17 h tras la infección (MDI de 0.5 ufp/célula) con los virus vaccinia recombinantes, el control WR, o sin infectar. A la izquierda de cada panel se muestra el marcaje de ADN (Hoescht), y por tanto el patrón nuclear del virus vaccinia, y a la derecha el correspondiente a las proteínas recombinantes (anti-C-Myc).

A continuación y dado que se ha descrito que la proteína de la cápsida del VHE se localiza tanto intracelularmente como en la superficie celular (104, 254), se estudió la posible localización de ambas formas recombinantes de ORF2 (ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv) en la superficie celular de células no permeabilizadas, infectadas con los virus vaccinia recombinantes correspondientes. Para este fin, se realizó un doble marcaje con un anticuerpo monoclonal (4G11) obtenido contra la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r durante el desarrollo de esta tesis (ver más adelante) que se conjugó con Alexa Fluor-488 (4G11-Alexa Fluor-488) y un anticuerpo policlonal anti-B5 que reconoce a la proteína B5 del virus vaccinia, la cual se expresa en la superficie de la forma extracelular del mismo (203), lo que, a su vez, permitiría determinar si la posible marca de estas proteínas recombinantes en la superficie de las células podría, de nuevo, corresponder al patrón típico del virus vaccinia.

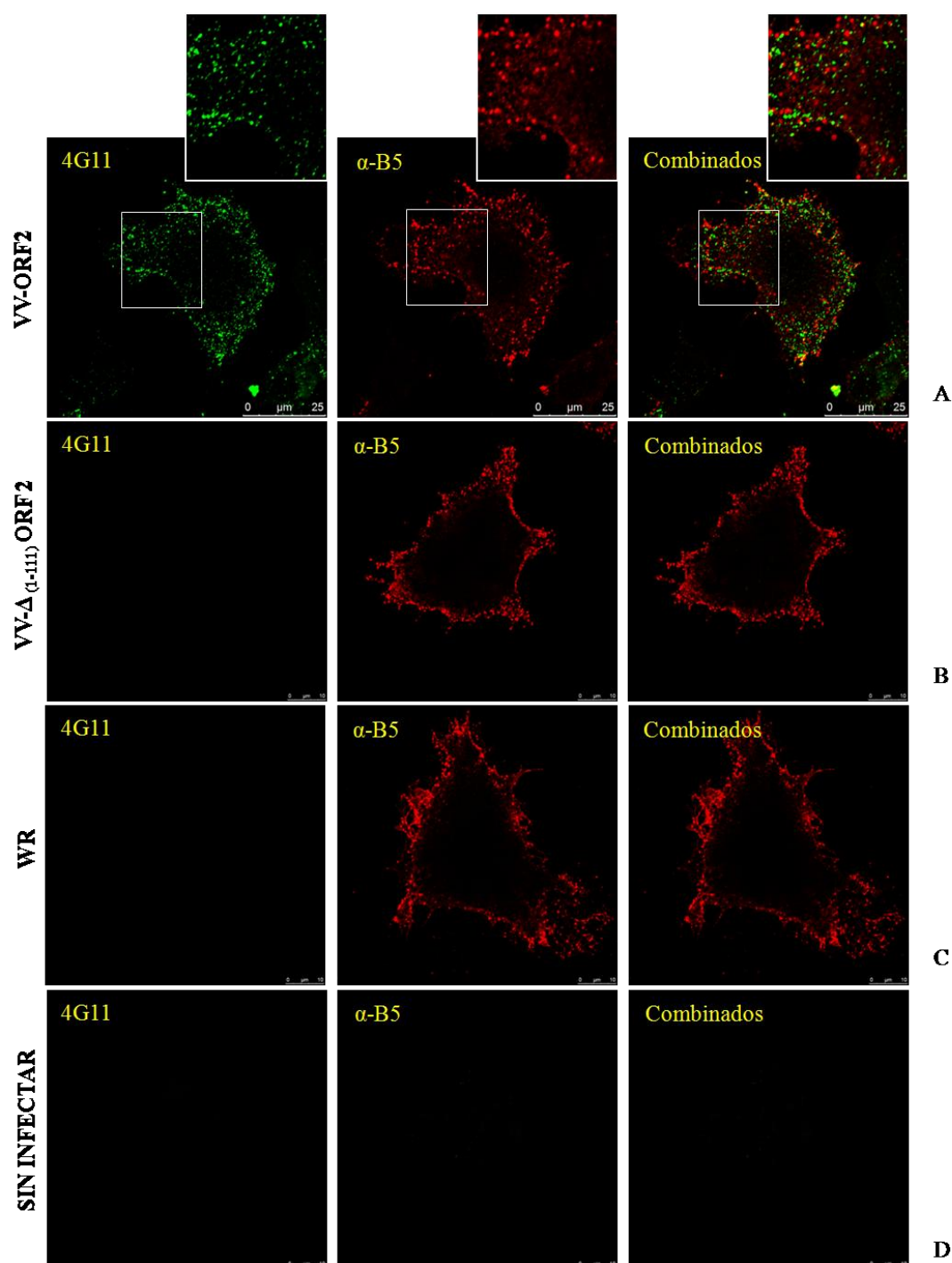


Figura 22. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión en superficie de las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r-vv y de su colocalización con el virus vaccinia. Las células BHK-21 se fijaron con PFA 4% sin permeabilizar a las 7 h tras la infección (MDI de 1 ufp /célula) con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 (A), VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2 (B), el control WR (C) o sin infectar. (D) Las células se incubaron primero con un anticuerpo monoclonal de rata anti-B5 (a dilución 1:100), seguido de un anticuerpo anti-rata Alexa Fluor-594 (a dilución 1:400) y después con el anticuerpo monoclonal de ratón 4G11 anti- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-conjugado con Alexa Fluor-488 (a dilución 1:300). Los recuadros blancos hacen referencia a las zonas de la célula ampliadas para apreciar mejor la ausencia de colocalización.

Los resultados obtenidos (Figura 22) indican que únicamente la proteína ORF2r-vv se localiza en la superficie celular y que esta localización no se corresponde con el patrón del virus vaccinia.

2. ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL VHE: DESARROLLO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO

El siguiente objetivo de esta tesis consistió en estudiar la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes obtenidas en los diferentes sistemas y su posible utilidad para el desarrollo de sistemas de diagnóstico tipo ELISA.

2.1 El sistema de baculovirus

2.1.1 Proteínas expresadas en células de insecto

2.1.1.1 Optimización de la dilución de antígeno con sueros humanos y porcinos

El primer paso consistió en determinar la concentración óptima de antígeno (ORF2r ó $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r) a emplear (Figura 23). Para ello se usaron diluciones de extracto total de células infectadas (desde 1:50 a 1:6400) y dos paneles de sueros (a dilución 1:100) humanos (n=8) y porcinos (n=8) positivos y negativos previamente caracterizados (29, 206), gentilmente cedidos por la Dra. M. Buti (Vall d'Hebron, Barcelona) y la Dra. Margarita Martín (CReSA, Barcelona). Para eliminar posibles reacciones inespecíficas, en el diluyente de los sueros se añadieron concentraciones similares de antígeno negativo, un extracto celular infectado con un baculovirus irrelevante. Además, también se testó la reactividad de los sueros en pocillos tapizados con el antígeno negativo.

Como puede apreciarse en la figura 23, la dilución óptima de ambas proteínas para su uso como antígeno en ELISA fue de 1:800, tanto con sueros humanos como porcinos. Además, el control negativo no presentó reactividad específica con los sueros empleados a ninguna de las concentraciones testada.

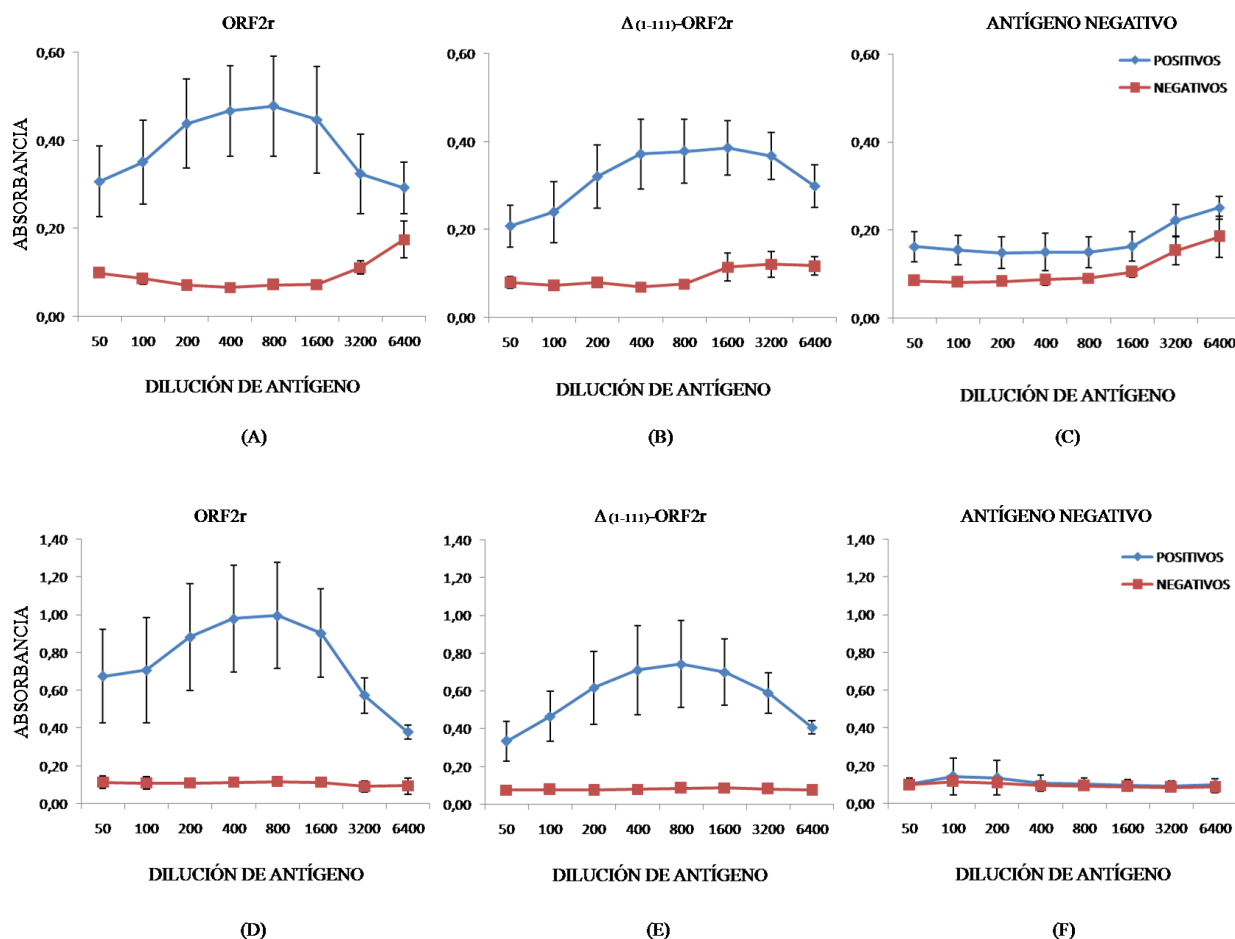


Figura 23. Optimización de la dilución de antígeno con sueros humanos y porcinos. Sueros humanos (A, B y C) y porcinos (D, E y F), positivos (círculos azules) y negativos (cuadrados rojos), se ensayaron mediante ELISA con diluciones seriadas (1/50 a 1/6400) de extractos crudos de células Sf21 de insecto infectadas con BAC-ORF2r (A y D), BAC- Δ -ORF2r (B y E) o con un baculovirus irrelevante (C y F) procesados como se describe en materiales y métodos. Los datos se expresan como la media de la A_{495} de 4 sueros negativos y 4 sueros positivos. Las barras representan los valores de desviación estándar de cada punto.

2.1.1.2 Optimización de la dilución de los sueros humanos y porcinos con ambos antígenos

Para establecer la concentración óptima de suero humano o porcino a emplear en el ensayo utilizando la dilución óptima de antígeno (ORF2r, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r) previamente establecida (1:800), se testaron diferentes diluciones de suero, desde 1:25 a 1:800. Como se observa en la figura 24, la dilución óptima de suero fue de 1:100 para ambas proteínas, tanto para los sueros humanos como para los porcinos. La especificidad de la reacción se confirmó ante la falta de reactividad observada en los controles negativos.

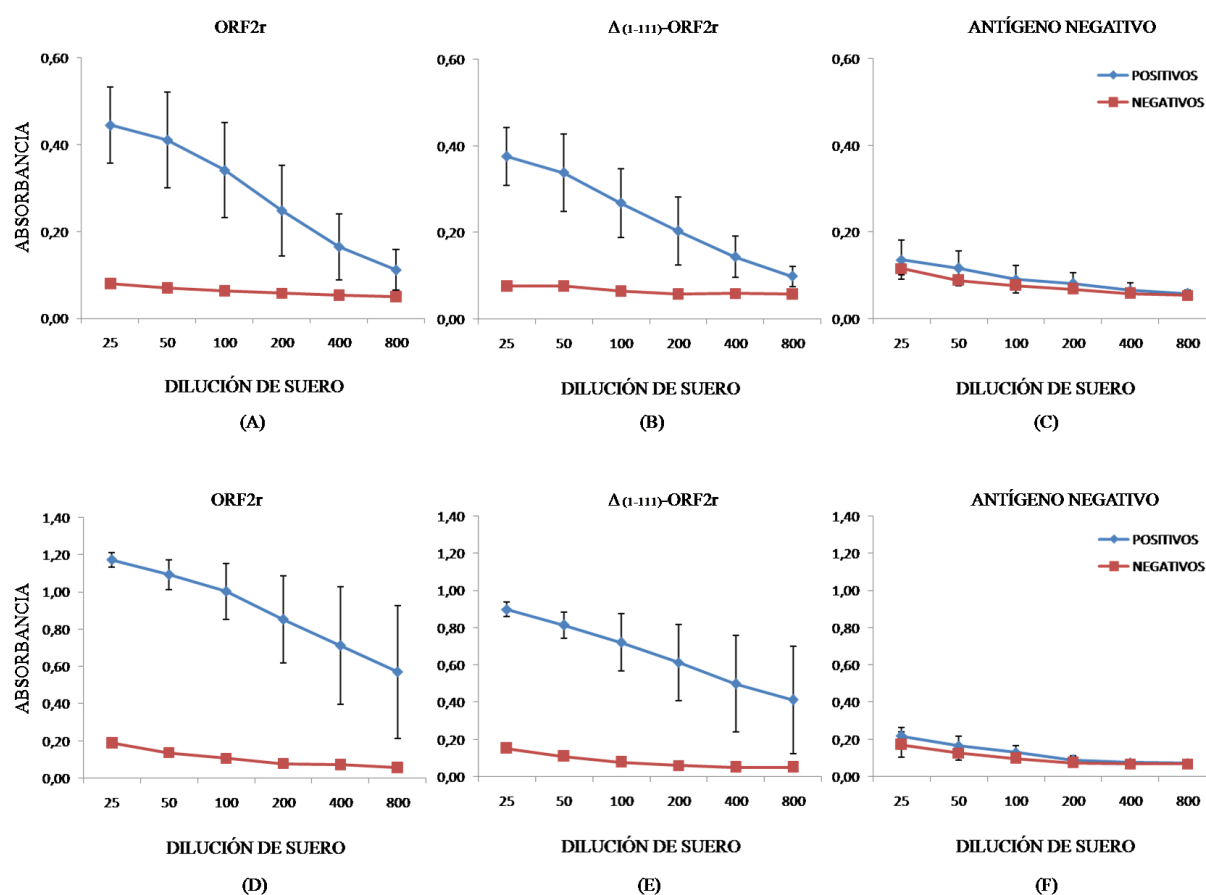


Figura 24. Optimización de la dilución de suero humano y porcino. Se ensayaron diluciones seriadas (1/25 a 1/800) en ELISA usando extractos crudos de células Sf21 de insecto infectadas con BAC-ORF2r (A y D), BAC- Δ -ORF2r (B y E) y con un baculovirus irrelevante (C y F) procesados como se describe en materiales y métodos, utilizando sueros humanos (A, B y C) y porcinos (D, E y F) positivos (círculos azules) y negativos (cuadrados rojos) previamente caracterizados. Los datos se expresan como la media de la A_{495} de 4 sueros negativos y 4 sueros positivos. Las barras representan los valores de desviación estándar de cada punto.

2.1.1.3 Criterio para el establecimiento del valor umbral

Para establecer el valor umbral de positividad se empleó una mezcla de 8 sueros de cerdo negativos para ARN del VHE que no reaccionaron en WB con ninguna de las proteínas recombinantes generadas (datos no mostrados). Estos sueros mostraron valores individuales de A_{495} menores a 0.15, tanto con los antígenos recombinantes (A_{495} 0.08-0.14) como con el antígeno negativo (A_{492} 0.08-0.12). De igual modo, en el caso de sueros humanos, se empleó una mezcla de 4 sueros negativos previamente caracterizados en ELISA (30), que resultaron también negativos para ARN del VHE y que no reaccionaron

en WB (datos no mostrados). Estos sueros humanos mostraron valores de A_{495} menores a 0,1 (A_{495} 0.06-0.09), tanto con los antígenos recombinantes como con el antígeno negativo.

El valor umbral se estableció en términos de P/N, siendo P igual al valor de la media de A_{495} del suero problema y N el valor de la media de la A_{495} del control negativo. Cuando el valor P/N de un suero fue mayor o igual a 2.5 se consideró que el suero era IgG positivo para el VHE.

2.1.1.4 Comparación de la reactividad de los antígenos recombinantes en ELISA

Se comparó la reactividad en ELISA usando ambos antígenos recombinantes, ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, expresados en células de insecto, mediante el ensayo de 32 sueros de cerdo y humano bajo las condiciones óptimas previamente establecidas y usando el valor umbral descrito en el apartado anterior. Como se observa en la figura 25, la concordancia entre ambos ELISA fue del 100%, tanto con sueros humanos como porcinos.

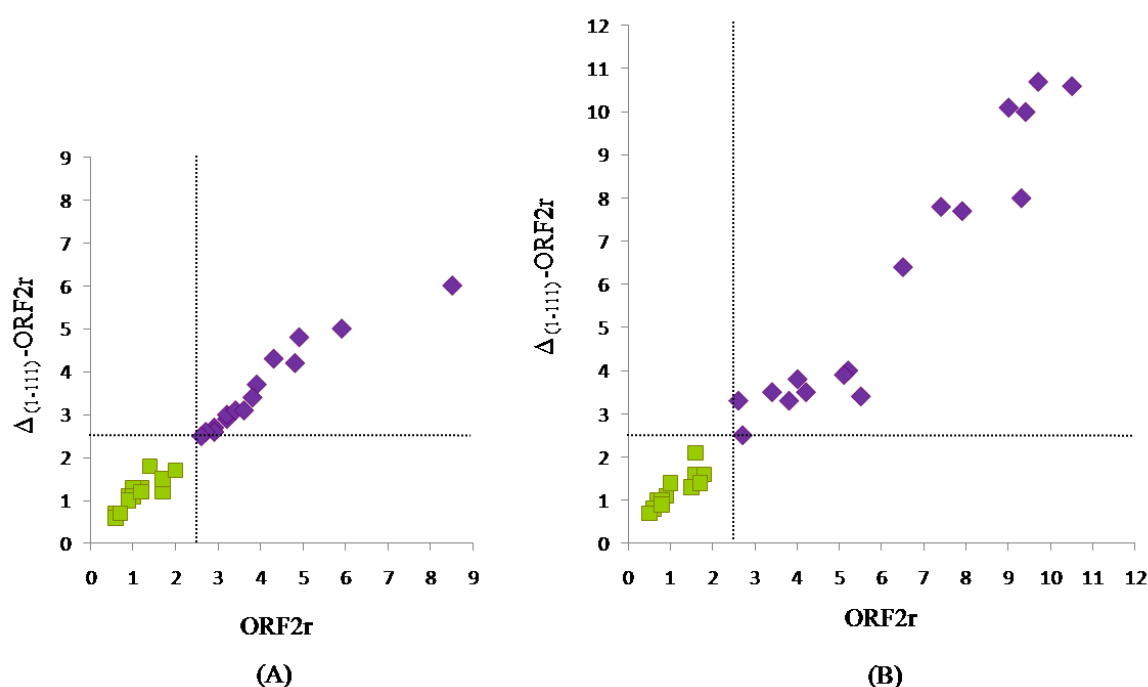


Figura 25. Comparación de la inmunorreactividad en ELISA de los antígenos recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r en ELISA. Se muestran los resultados de los ELISA con sueros humanos (A) y porcinos (B) utilizando las proteínas recombinantes ORF-2r y Δ -ORF2r como antígenos. Los ELISA se realizaron como se describe en materiales y métodos. Los datos se expresan como P/N. Las líneas punteadas verticales y horizontales representan el valor umbral de cada ensayo ($P/N \geq 2.5$). Los cuadrados verdes y los rombos morados indican los sueros que resultaron negativos o positivos, en ambos ensayos.

2.1.2. Proteínas parcialmente purificadas de larvas de insecto

Los mismos análisis llevados a cabo con los extractos crudos de células Sf21 de insecto se realizaron con las proteínas recombinantes parcialmente purificadas (ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r) a partir de extractos de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes.

2.1.2.1 Optimización de la concentración de antígeno con sueros humanos y porcinos

Con el fin de establecer la concentración óptima de antígeno para tapizar los pocillos de las placas de ELISA se testaron diferentes concentraciones de antígeno, 7.5-60 ng/pocillo, a una dilución única de suero (1:100). Como control negativo se empleó antígeno irrelevante procesado igual que los antígenos específicos.

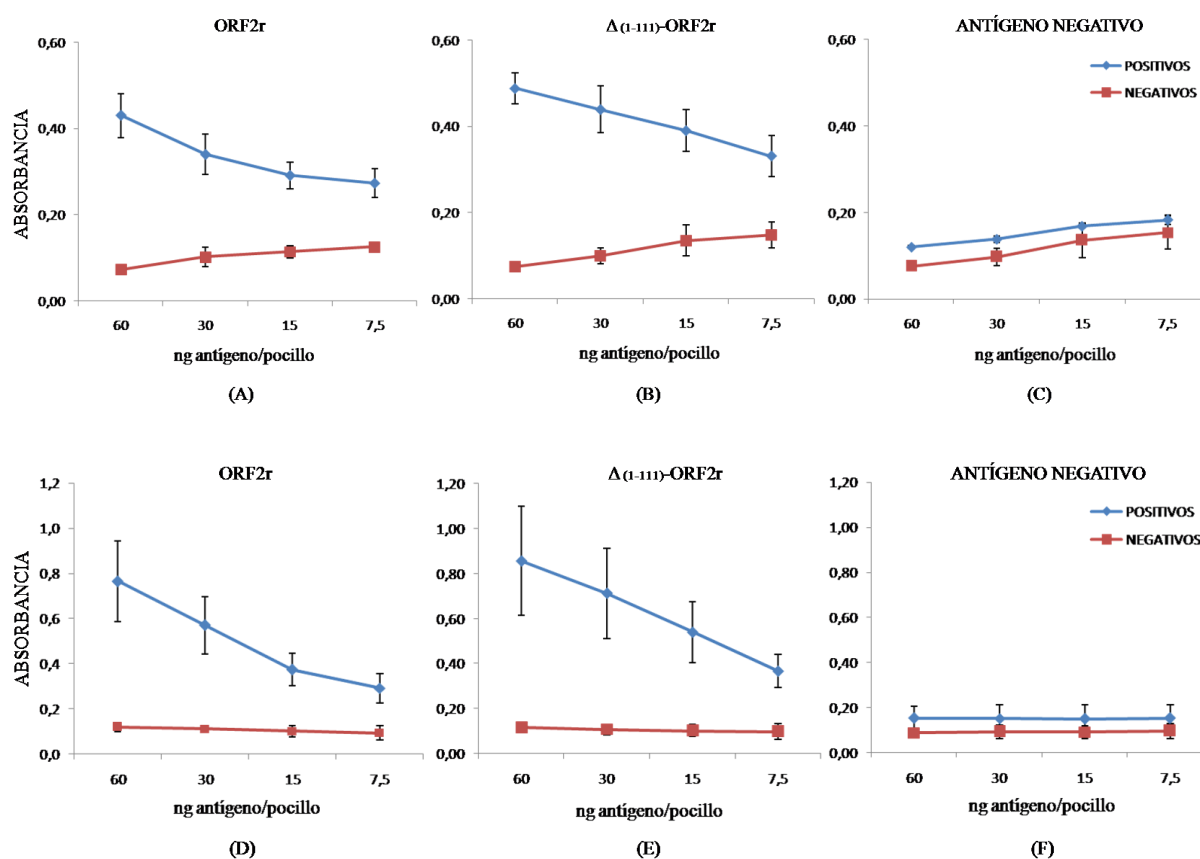


Figura 26. Optimización de la dilución de antígeno parcialmente purificado con sueros humanos y porcinos. Sueros humanos (A, B y C) y porcinos (D, E y F) positivos (círculos azules) y negativos (cuadrados rojos) previamente caracterizados se ensayaron mediante ELISA con diluciones seriadas (7.5 -60 ng/pocillo) de antígeno ORF2r (A y D), $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r (B y E) y antígeno negativo irrelevante (C y F) parcialmente purificado como se describe en materiales y métodos. Los datos se expresan como la media de la A_{495} de 4 sueros negativos y 4 sueros positivos. Las barras representan los valores de desviación estándar de cada punto.

Los resultados obtenidos indicaron que la concentración óptima de antígeno es de 15 y 30 ng/pocillo para $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r y ORF2r, respectivamente (Figura 26). De nuevo, la especificidad de la reacción se demostró por la ausencia de reactividad observada en los controles negativos incluidos en los ensayos.

2.1.2.2 Optimización de la dilución de sueros humanos y porcinos

Los resultados obtenidos (Figura 27) realizados como se ha descrito anteriormente, permitieron establecer que, de nuevo, la dilución óptima de suero para ambas especies, humano y cerdo, fue de 1:100. La especificidad de la reacción se confirmó, de nuevo, ante la falta de reactividad observada en los controles negativos.

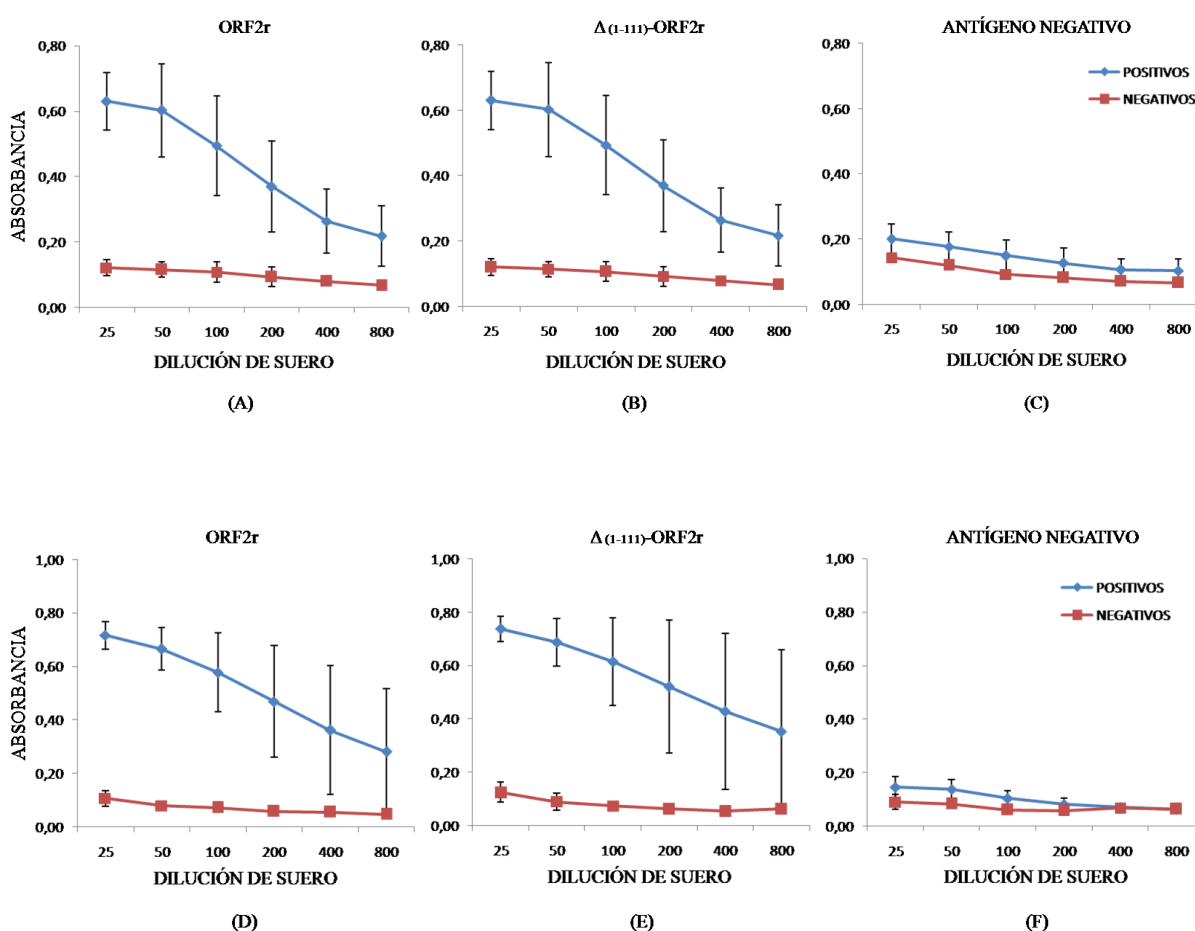


Figura 27. Optimización de la dilución de suero humano y porcino. Se ensayaron diluciones de suero seriadas (1/25 a 1/800) en ELISA usando las proteínas recombinantes ORF2r (A y D), Δ -ORF2r (B y E) y las obtenidas con un baculovirus irrelevante (C y F) parcialmente purificadas tal y como se describe en materiales y métodos, utilizando sueros humanos (A, B y C) y porcinos (D, E y F) positivos (círculos azules) y negativos (cuadrados rojos) previamente caracterizados. Los datos se expresan como la media de la A_{495} de 4 sueros negativos y 4 sueros positivos. Las barras representan los valores de desviación estándar de cada punto.

2.1.2.3 Criterio para el establecimiento del valor umbral

El valor umbral se estableció como se ha descrito anteriormente. En este caso, los valores de A_{495} fueron menores a 0.15 (A_{495} 0.05-0.14) para los sueros de ambas especies.

2.1.2.4 Comparación de la reactividad de los antígenos recombinantes en ELISA

Al igual que se había hecho con los ELISA desarrollados con los extractos crudos de células Sf21 de insecto, se llevó a cabo una comparación entre los ELISA basados en el uso de proteínas recombinantes parcialmente purificadas.

En este caso se testaron 106 sueros humanos, observándose una concordancia del 99%. El único suero discordante sólo reconoció la forma truncada, si bien con unos valores de P/N cercanos al valor umbral. Además, el análisis por WB de este suero mostró que reconocía ambas proteínas recombinantes.

Por otra parte, se analizaron 345 sueros porcinos observándose una concordancia entre ambos antígenos del 98.8%. De nuevo, los 4 sueros discordantes presentaron unos valores de P/N cercanos al valor umbral. En dos casos, los sueros únicamente reaccionaron en ELISA con la forma truncada y en los otros dos con la completa, pero los 4 sueros reaccionaron con ambas proteínas en WB.

Un análisis adicional de la reactividad de 32 sueros humanos y porcinos, reconocidos en ELISA por ambas proteínas purificadas, con los antígenos celulares, mostró resultados equiparables con ambos sistemas de diagnóstico.

2.2 El sistema de vaccinia

2.2.1 Proteínas expresadas en células de mamífero

Para la determinación de la capacidad antigénica de las proteínas del VHE expresadas en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes se llevaron a cabo ensayos como los anteriormente descritos. Sin embargo, en esta ocasión, únicamente se utilizaron sueros porcinos.

2.2.1.1 Optimización de la dilución de antígeno y suero

La dilución óptima de extracto crudo de células infectadas con los respectivos virus vaccinia recombinantes se determinó usando el mismo panel de 8 sueros porcinos (a dilución 1:100) usados anteriormente.

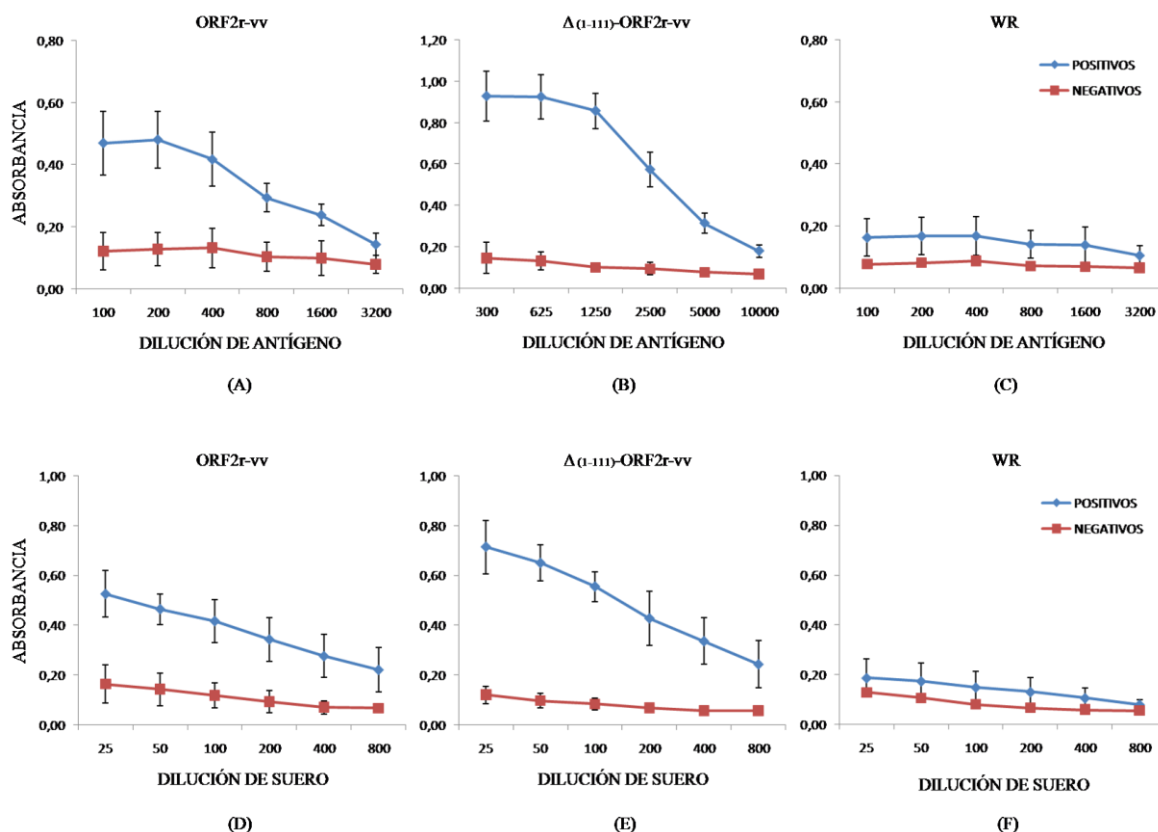


Figura 28. Optimización de la dilución de antígeno y de la dilución de suero con sueros porcinos.

En el panel superior (A, B y C) se muestra la optimización de la dilución de antígeno usando sueros porcinos positivos (círculos azules) y negativos (cuadrados rojos), previamente caracterizados, mediante ELISA con diluciones seriadas de antígeno, 1:100 a 1:3200 para ORF2r-vv (A) y el antígeno negativo WR (C) y 1:300 a 1:10000 para $\Delta(1-111)$ -ORF2r-vv (B), como se describe en materiales y métodos. En el panel inferior (D, E y F) se muestra la optimización de la dilución de suero (desde 1:25 a 1:800) usando los extractos celulares de las infecciones con los virus vaccinia recombinantes y el control de virus vaccinia silvestre en las condiciones establecidas previamente. Los datos se expresan como la media de la A_{495} de 4 sueros negativos y 4 sueros positivos. Las barras representan los valores de desviación estándar de cada punto.

El ensayo se llevó a cabo variando la dilución del antígeno desde 1:100 a 1:3200 para la forma recombinante ORF2r-vv y el antígeno negativo WR, y de 1:300 a 1:10.000 para la forma recombinante $\Delta(1-111)$ -ORF2r-vv, manteniendo constante la dilución de suero a 1:100 (Figura 28).

Una vez establecida la dilución óptima de antígeno, que resultó ser de 1:500 y 1:2500 para ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv, respectivamente, se determinó la dilución óptima de suero mediante el ensayo de diluciones seriadas de sueros porcinos (1:25 a 1:800), que resultó ser de 1:100 (Figura 28). De nuevo, no se observó reactividad del control negativo empleado, un virus vaccinia silvestre, WR, a ninguna de las diluciones de suero testada.

2.2.1.2 Criterio para el establecimiento del valor umbral

Para establecer el valor umbral del ensayo se utilizó el mismo criterio que el empleado anteriormente, usando el mismo panel de sueros porcinos negativos para ARN del VHE y que no reaccionaban con ninguna de las proteínas recombinantes en WB. Estos sueros mostraron valores de A_{495} , menores a 0.15 (A_{495} 0.05-0.14) con los antígenos recombinantes y con los antígenos negativos. En este caso, el umbral se estableció en un valor de P/N mayor o igual a 2.

2.2.1.3 Comparación de antígenos recombinantes en ELISA

Con el fin de comparar la reactividad antigénica entre las proteínas expresadas en el sistema del virus vaccinia, se testaron 55 sueros porcinos mediante ambos ELISA, observándose una concordancia del 94.5%.

A continuación se compararon los resultados obtenidos con ambas proteínas recombinantes expresadas en los dos sistemas utilizados (baculovirus y vaccinia). Los resultados obtenidos utilizando 57 sueros porcinos indican que la concordancia entre los dos sistemas fue del 89.5% cuando se usó como antígeno la forma completa de la proteína, ORF2r-vv. Por su parte, el análisis con 70 sueros porcinos y la forma truncada del antígeno, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv resultó en una concordancia del 92.8%. En todos los casos, las discordancias se debieron a sueros que únicamente reaccionaban con los antígenos expresados en el sistema de baculovirus.

3. VALIDACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL ELISA DESARROLLADO CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARCIALMENTE PURIFICADAS DE LARVAS DE INSECTO.

En la actualidad son escasos los estuches comerciales de diagnóstico disponibles en el mercado para evaluar la presencia de anticuerpos anti-VHE. Estos estuches incluyen proteínas y péptidos de genotipo I y II, pero no de genotipo III, prevalente en cerdos y humanos de Europa y Norteamérica y se ha reportado que en algunos casos no son capaces de detectar infecciones causadas por este genotipo. Además, los estuches están diseñados para su uso en humanos, pero no en muestras porcinas.

Por todo ello, el siguiente objetivo de este trabajo fue la validación del ELISA desarrollado basado en el uso de la forma truncada, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, de la proteína recombinante parcialmente purificada, mediante su comparación con el estuche comercial de diagnóstico más frecuentemente empleado en la actualidad: MP Diagnostic HEV ELISA (GENELABS). El estudio se realizó tanto con sueros humanos como porcinos, si bien en este último caso hubo que variar ligeramente las condiciones descritas por los fabricantes al tener que utilizar un anticuerpo secundario específico de cerdo, no incluido en el estuche comercial, tal y como se describe en materiales y métodos.

Tabla 8.: Concordancia en la detección de IgG del VHE entre un estuche comercial y el ELISA basado en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r.

		ESTUCHE COMERCIAL					
		HUMANOS ^a			PORCINOS ^b		
		POS	NEG	TOTAL	POS	NEG	TOTAL
ELISA $\Delta_{(1-111)}$ ORFr	POS	10	3	13	23	8	31
	NEG	1	26	27	5	30	35
	TOTAL	11	29	40	28	38	66

^aConcordancia, 92.5% (kappa=0.82)

^bConcordancia, 80% (kappa=0.60)

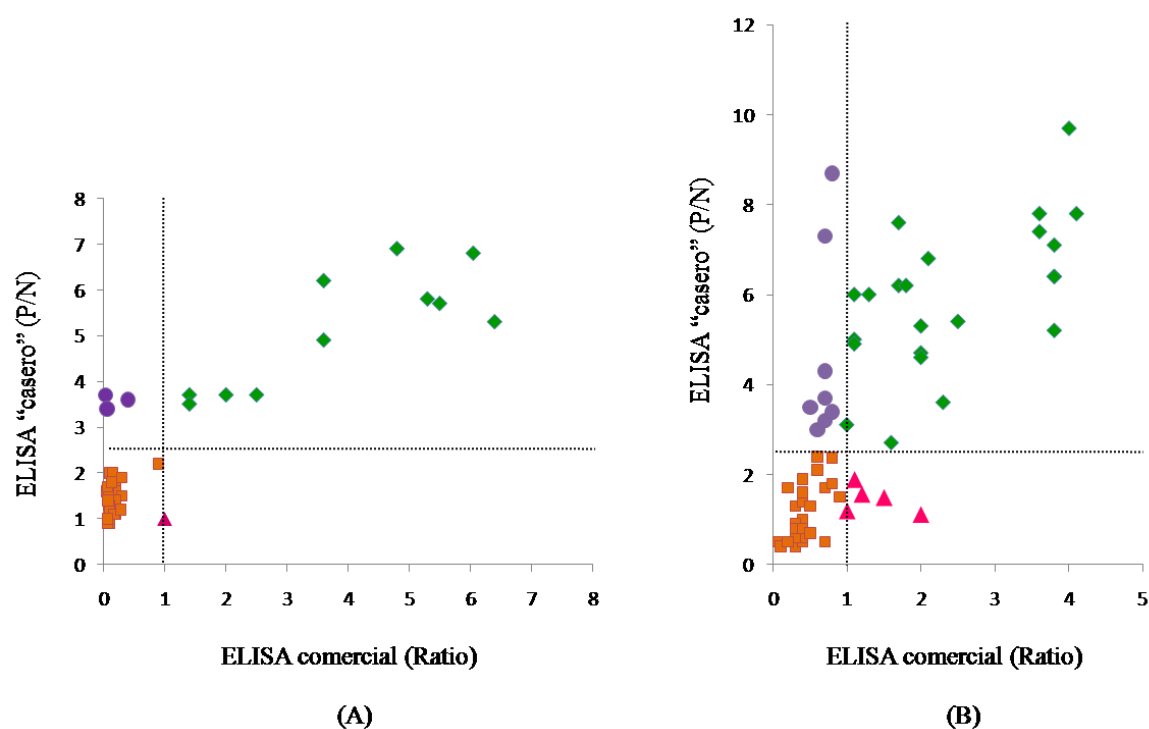


Figura 29. Comparación de la inmunorreactividad del ELISA basado en el uso de $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r y un ELISA comercial usando sueros humanos (A) y porcinos (B). Los ELISA se desarrollaron tal y como se indica en Materiales y métodos. Las líneas punteadas verticales y horizontales representan los valores umbral de cada sistema ($P/N \geq 2.5$ para el ELISA basado en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r y $P/N \geq 1$ para el ELISA comercial). Los cuadrados naranjas representan los sueros negativos para ambos sistemas, los rombos verdes los que son positivos para ambos sistemas, los círculos morados los sueros positivos sólo para el ELISA de $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r y los triángulos rosas los sueros positivos sólo para el estuche comercial.

Los resultados obtenidos tras el análisis de 43 sueros humanos y 66 sueros porcinos con el estuche comercial y el ELISA desarrollado en este trabajo mostraron una concordancia del 92.5 % ($\kappa = 0.82$) y del 80 % ($\kappa = 0.60$), respectivamente (Figura 29 y Tabla 8).

Con el fin de resolver la reactividad de aquellos sueros que presentaron un resultado discordante (4 sueros humanos y 13 sueros porcinos), éstos se analizaron mediante WB, que fue, pues, utilizado como ensayo de referencia (*gold standard*). El análisis incluyó varios sueros positivos (3 sueros humanos y 17 sueros porcinos) y varios negativos (6 sueros humanos y 12 sueros porcinos) que se seleccionaron al azar, con igual resultado con ambos sistemas. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9.: Resultados del análisis mediante WB de sueros concordantes y discordantes con los diferentes sistemas de ELISA empleados.

SUEROS		CONCORDANTES			DISCORDANTES		
		ELISA $\Delta_{(1-111)}$ - ORF2r	ELISA comercial	WB	ELISA $\Delta_{(1-111)}$ - ORF2r	ELISA comercial	WB
HUMANOS	POSITIVOS	3	3	3	3	1	2
	NEGATIVOS	6	6	6	1	3	2
PORCINOS	POSITIVOS	17	17	17	8	5	9
	NEGATIVOS	12	12	12	5	8	5

Cuando se usó el WB como ensayo de referencia se determinó que para los sueros porcinos la especificidad del sistema basado en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r fue del 100% y la del sistema comercial que fue del 88.2%, mientras que la sensibilidad fue del 96.9% y del 83.3%, respectivamente. Cuando el análisis se realizó con sueros humanos, las especificidades fueron del 96.4% para ambos sistemas, mientras que la sensibilidad fue mayor en el caso del sistema basado en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, 100% y 75%, respectivamente (Tabla10).

Tabla 10.: Sensibilidad y especificidad de ambos sistemas de ELISA.

	ESPECIFICIDAD		SENSIBILIDAD	
	Humano	Porcino	Humano	Porcino
ELISA "casero"	96,4 %	100 %	100 %	96,9 %
ELISA comercial	96,4 %	88,2 %	75 %	83,3 %

Comparación de la sensibilidad y la especificidad del ELISA comercial y el ELISA basado en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r con sueros humanos y porcinos, usando el WB como ensayo de referencia.

4. DETECCIÓN DEL ARN DEL VHE Y ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS IgG ANTI-VHE EN LA CABAÑA PORCINA ESPAÑOLA

Una vez desarrolladas y validadas las herramientas para la detección serológica de la infección por el VHE, el siguiente objetivo de esta tesis fue la detección de la prevalencia de ARN del VHE y de anticuerpos IgG anti-VHE en la cabaña porcina española.

Para ello se usaron 1141 muestras séricas obtenidas de granjas localizadas en cuatro comunidades autónomas (Figura 30), tal y como se muestra en materiales y métodos.



Figura 30. Provincias en las que se localizaban las granjas de cerdos en las que se obtuvieron las muestras de suero.

4.1 Herramientas de detección de anticuerpos y ARN del VHE

Para el estudio de la prevalencia de anticuerpos del VHE en la cabaña porcina se empleó el ELISA que usa el antígeno $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificado, desarrollado y validado en el transcurso de esta tesis.

Para la detección del ARN del VHE en las muestras de suero porcino se utilizó una RT-PCR anillada con oligonucleótidos específicos que amplifican una región de 350 pb de ORF2, tal y como se describe en materiales y métodos (Figura 31).

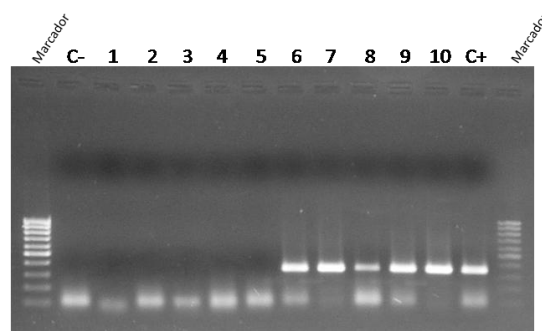


Figura 31. Detección de ARN del VHE mediante RT-PCR anillada. C- y C+, controles negativo y positivo, respectivamente, de extracción de ARN. Los carriles 1-10 pertenecen a distintas muestras analizadas. Las muestras positivas (carriles 6-10) muestran un fragmento específico de amplificación de 350 pb. En los carriles laterales aparecen los marcadores de masa molecular.

4.2 Detección serológica de anticuerpos frente al VHE

Los datos obtenidos muestran que la infección con el VHE estaba diseminada por toda la geografía española, un total de 233 sueros (20.4%) resultaron positivos por ELISA (Tabla 11), detectándose animales seropositivos en todas las provincias estudiadas. Los resultados indicaron que la seroprevalencia no era uniforme en las diferentes provincias, variando desde el 2.5% de Salamanca hasta el 26.4% de Zaragoza, pero estas variaciones no tenían una clara relación geográfica, puesto que se detectaron prevalencias muy distintas en provincias limítrofes como, por ejemplo, Lérida y Huesca, así como en granjas próximas situadas en una misma provincia (datos no mostrados).

Cuando se compararon las seroprevalencias detectadas en animales mayores de 6 meses o menores de 6 meses de edad, se observó que ésta era significativamente mayor en los primeros, 30.2% y 15.5%, respectivamente (Tabla 11). Aunque las proporciones de animales seropositivos en ambos grupos de animales variaba mucho en las provincias estudiadas, entre el 4.8% y el 37% en los primeros y entre el 0% y el 20% en los segundos, siempre fue mayor en los animales adultos, resultando las diferencias estadísticamente significativas en Zaragoza, Teruel, Lérida y en el conjunto de la población.

El estudio realizado detectó la presencia de animales seropositivos en todas las provincias analizadas. Más del 80% (69/85) de las piaras estudiadas tenían, al menos, un animal seropositivo, variando el porcentaje de granjas en las que se detectaron animales con IgG anti-VHE en suero entre las diferentes provincias entre el 60.7% y el 100% (Tabla

12). De modo similar, el porcentaje de animales positivos en las distintas granjas analizadas que presentaron serología positiva también fue muy variable, de 2.9% a 100%.

Tabla 11. Seroprevalencia de IgG anti-HEV en cerdos (adultos y jóvenes) en las diferentes provincias incluidas en el estudio.

SUEROS PORCINOS		COMUNIDAD AUTÓNOMA						
			ARAGÓN			CASTILLA-LEÓN	ANDALUCÍA	CATALUÑA
			PROVINCIA					
POSITIVO /TOTAL (%)		TODAS (***)	HUESCA	ZARAGOZA (***)	TERUEL (*)	SALAMANCA	JAÉN	LÉRIDA (*)
	TODOS	233/1141 (20.4)	25/136 (18.4)	168/637 (26.4)	20/128 (15.6)	3/122 (2.5)	15/74 (20.3)	2/44 (4.5)
	ADULTOS	115/381 (30.2)	5/26 (19.2)	95/257 (37)	8/28 (28.6)	2/42 (4.8)	3/14 (21.4)	2/14 (14.3)
	JÓVENES	118/760 (15.5)	20/110 (18.2)	73/380 (19.2)	12/100 (12)	1/80 (1.3)	12/60 (20)	0/30 (0)

Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.5^*$, $p < 0.005^{**}$, $p < 0.0005^{***}$) entre las prevalencias detectadas en animales jóvenes y adultos cuando se compararon en todas las provincias en su conjunto ($p < 0.0001$), así como en Zaragoza ($p < 0.0001$), Teruel ($p < 0.03$) y Lérida ($p < 0.3$).

Tabla 12. Porcentaje de granjas con al menos un animal con serología positiva en las distintas provincias incluidas en el estudio.

GRANJAS	PROVINCIA						
	Huesca	Zaragoza	Teruel	Salamanca	Jaén	Lérida	Total
Positivas/ total (%)	2/2 (100)	61/76 (80.3)	2/2 (100)	1/3 (60.7)	1/1 (100)	1/1 (100)	69/85 (81.2)

4.3 Distribución de IgG anti-VHE en relación a la edad de los animales

En 5 de las granjas correspondientes a 3 comunidades autónomas, se pudieron obtener muestras de animales jóvenes durante varias semanas sucesivas. Las muestras se seleccionaron de forma aleatoria en las semanas sucesivas, de forma que los sueros analizados no tienen por qué corresponder a un mismo animal. Tal y como se muestra en la tabla 13, la prevalencia de IgG anti-VHE encontrada en los animales a las 3 semanas (6.9%) disminuía gradualmente hasta la semana 11 (1.4%) para volver a aumentar en la semana 15 (31%) hasta alcanzar valores similares a los detectados en la población adulta analizada en el conjunto de las regiones estudiadas (30.2%), (Tabla 11).

Tabla 13. Seroprevalencia de IgG anti-HEV en cerdos jóvenes a diferentes semanas.

	SEMANA						
	TODAS	3ª	5ª	7ª	11ª	15ª	20ª
POSITIVO /TOTAL	61/620	9/130	4/120	2/120	1/70	31/100	14/80
(%)	(9.8)	(6.9)	(3.3)	(1.7)	(1.4)	(31)	(17.5)

4.4 Estudio de la relación entre la presencia de ARN del VHE y de IgG anti-VHE en la cabaña porcina

4.4.1 Prevalencia del ARN del VHE

La presencia del ARN del VHE (Tabla 14) se analizó en un grupo de 341 sueros pertenecientes a 72 granjas (30 de animales jóvenes, menores de 6 meses de edad, y 42 de cerdas adultas reproductoras, mayores de 6 meses de edad) de la provincia de Zaragoza mediante la RT-PCR anillada descrita anteriormente. En un total de 64 animales (18.8%) se detectó una infección activa por el VHE, siendo la proporción de animales positivos para el ARN del VHE significativamente mayor ($p < 0.006$) entre los animales jóvenes (25.7%) que entre los adultos (13.9%).

Cuando se analizó la presencia de infección activa en las granjas (Tabla 14) se observó que prácticamente en la mitad de ellas (47.2%), al menos un animal había resultado positivo en el análisis del ARN del VHE, siendo mayor la proporción de

animales que presentaban infección activa en las granjas de animales jóvenes que en las de adultos (60% y 38.1%, respectivamente).

Tabla 14. Prevalencia del ARN del VHE en cerdos (menores de 6 o mayores de 6 meses de edad) y granjas.

	CERDOS (edad en meses)			GRANJAS		
	TODOS (**)	< 6	> 6	TODAS	CEBO	REPRODUCTORAS
POSITIVOS/TOTAL	64/341	36/140	28/201	34/72	18/30	16/42
(%)	(18.8)	(25.7)	(13.9)	(47.2)	(60)	(38.1)

Las diferencias fueron estadísticamente significativas ** ($p=0.0061$) cuando se comparó la prevalencia del ARN del VHE entre los sueros de jóvenes y adultos.

4.4.2 Prevalencia de IgG anti-VHE

Los datos del análisis de la prevalencia de IgG anti-VHE en el mismo grupo de 341 sueros pertenecientes a las 72 granjas de Zaragoza (Tabla 15) refleja la mayor prevalencia encontrada en los animales de Aragón en general (Tabla 11). Sin embargo, en este caso, y al contrario que lo detectado en el resto de las regiones analizadas, las prevalencias fueron similares entre los animales jóvenes y los adultos, 40.7% y 38.8%, respectivamente (Tabla 15). En cualquier caso, hay que destacar que no se dispuso de información sobre la semana de edad a la que se obtuvieron las muestras séricas de estos animales jóvenes, salvo que esta se llevó a cabo antes de que los animales alcanzaran los 6 meses de edad. Por lo tanto, si el muestreo se realizó cuando los animales tenían más de 15 semanas, los datos de prevalencia obtenidos (38.8%) no se diferencian demasiado de los observados (31%) en los animales de más de 15 semanas de edad analizados en el estudio de prevalencia realizado en semanas sucesivas (Tabla 13).

Tabla 15. Prevalencia de IgG anti-VHE en cerdos (de menos de 6 o más de 6 meses de edad) y granjas.

	CERDOS (edad en meses)			GRANJAS		
	TODOS	< 6	> 6	TODAS	CEBO	REPRODUCTORAS
POSITIVOS/TOTAL (%)	135/341 (39.6)	57/140 (40.7)	78/201 (38.8)	57/72 (79.2)	24/30 (80)	33/42 (78.6)

El análisis de la prevalencia de IgG anti-VHE por granja reveló un porcentaje de granjas positivas (79.2%) similar al encontrado al analizar la totalidad de las granjas estudiadas (Tabla 15). En este caso, este porcentaje de granjas positivas fue similar en el caso de las explotaciones de cebo y de las de cerdas reproductoras.

Cuando se analizaron conjuntamente las prevalencias de ARN del VHE y de IgG anti-VHE en el mismo grupo de 341 animales (Tabla 16) se observó que prácticamente la mitad de los cerdos (48.4%) no presentaban ninguno de los marcadores de infección por el virus. En el 12% de los mismos se detectó el ARN vírico, pero no anticuerpos específicos, mientras que en el 6.7% se detectaron ambos marcadores. Finalmente, en el 32.8% de los animales se pudo comprobar la presencia de una infección anterior, dado que en ellos no se detectó ARN vírico, pero sí la presencia de IgG anti-VHE.

Tabla 16. Prevalencia de IgG anti-HEV y de ARN-VHE en cerdos (jóvenes y adultos).

		CERDOS (n°)		
		TODAS (341)	REPRODUCTORAS (201)	CEBO (140)
POSITIVOS (%)	RNA- / IgG-	165 (48.4)	106 (52.7)	59 (42.1)
	RNA+ / IgG-	41 (12)*	17 (8.5)	24 (17.1)
	RNA+ / IgG+	23 (6.7)	11(5.5)	12 (8.6)
	RNA- / IgG+	112 (32.8)	67 (33.3)	45 (32.1)

Las diferencias sólo fueron significativas entre jóvenes y adultos *(p=0.015) en el análisis de los animales RNA+ / IgG-.

4.5 Análisis filogenético del VHE

Una docena de muestras positivas seleccionadas al azar se purificaron y secuenciaron bidireccionalmente. Las secuencias se alinearon y compararon con otras secuencias representativas de los 4 genotipos del VHE obtenidas de bases de datos de acceso libre y con ellas se llevó a cabo un análisis filogenético. Tal y como se muestra en la figura 32, todas ellas pertenecían al genotipo III. Únicamente una secuencia mostró dos cambios de nucleótido (0.7%). Las muestras secuenciadas diferían de la muestra usada como control (U24), obtenida de las heces de un cerdo infectado naturalmente de la provincia de Valencia (gentilmente cedida por la Dra. M.T. Pérez-Gracia, U. Cardenal Herrera-CEU, Valencia) en un 4.8-5.1%.

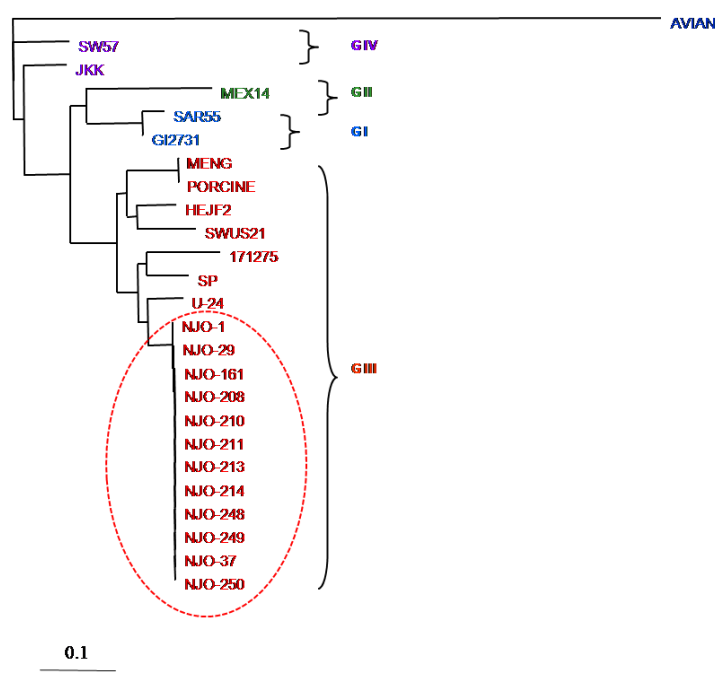


Figura 32. Estudio filogenético de muestras positivas para ARN del VHE seleccionadas de forma aleatoria. En este árbol filogenético se incluyen muestras secuenciadas en este estudio (en un círculo rojo) comparadas con secuencias correspondientes a los 4 genotipos (GI-GIV) del VHE. Como secuencia externa se utilizó una secuencia correspondiente a un aislado aviar.

5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS Y VIRUS RECOMBINANTES EN EL MODELO MURINO

El siguiente objetivo planteado en esta tesis fue el ensayo de la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, expresadas en baculovirus y de los virus vaccinia VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, en el sistema murino (ratonas Swiss), con el fin de determinar su potencial como posibles candidatos vacunales. Además, se analizó la capacidad de transmisión vertical de la inmunidad adquirida por ratonas gestantes.

5.1 Inmunización con proteínas recombinantes generadas en el sistema de baculovirus

Se ensayó en ratones la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, parcialmente purificadas de larvas de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes.

En un primer experimento se inocularon, por vía intraperitoneal, 3 ratones con cada una de las proteínas diluidas en PBS administradas en 2 dosis a intervalos de 15 días. Se incluyó un grupo control inoculado únicamente con PBS. Los ratones se sangraron antes de la primera inoculación y a día 7, 14, 30, 45 y 56 post- inoculación (d.p.i.), momento en que fueron anestesiados y sacrificados. Además se inocularon grupos de 4 ratones a los que se les administraron los inmunógenos con adyuvante completo de Freund en la primera dosis, y con adyuvante incompleto de Freund en la última dosis. Estos ratones se sangraron a 14 y 30 d.p.i., momento en que fueron anestesiados y sacrificados. La dosis inicial para ambos grupos fue de 100 μ g de proteína/ratón, seguida de una dosis de 50 μ g. Además, se incluyó un grupo control inoculado con PBS y adyuvante de Freund. La producción de anticuerpos específicos en los ratones inoculados se analizó por ELISA, empleando como antígeno las proteínas recombinantes parcialmente purificadas de larvas, así como las expresadas por los virus vaccinia recombinantes, y en ambos casos los niveles de anticuerpos detectados fueron similares.

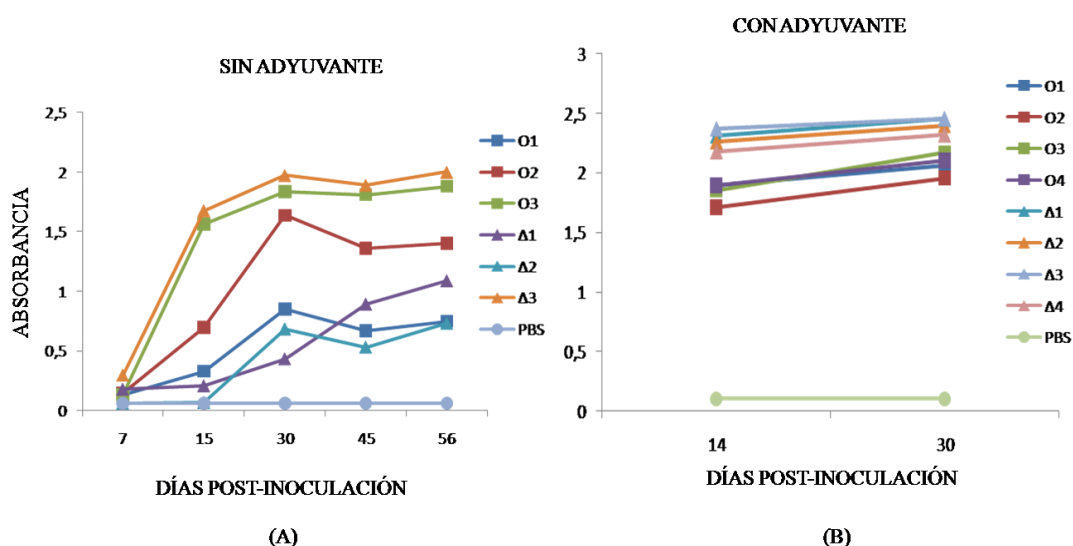


Figura 33. Títulos de anticuerpos (IgG anti-VHE) en ratones ensayados con las proteínas recombinantes. Generación de anticuerpos específicos en los ratones inoculados con las proteínas recombinantes ORF2r (O), $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r (Δ) o con PBS (PBS) en ausencia (A) y presencia (B) de adyuvante de Freund, mostrados como valores de A_{495} en ELISA.

Tal y como se muestra en la figura 33A, todos los animales presentaron anticuerpos específicos a 30 d.p.i., cuando los animales habían recibido dos dosis, si bien se observó que los títulos obtenidos eran variables, ya que sólo algunos de estos animales presentaron títulos altos. Estos anticuerpos permanecieron detectables hasta el día del sacrificio, 56 d.p.i. En el experimento en el que se utilizó adyuvante (Figura 33B) a los 14 d.p.i., con una única dosis recibida, todos los animales presentaron anticuerpos específicos con títulos elevados que se mantuvieron hasta día 30 p.i.

Una vez establecida la capacidad inmunogénica de ambas proteínas y el efecto del adyuvante, se diseñó un experimento para determinar el efecto de la dosis de inmunógeno administrada. Con este fin, se ensayaron tres dosis (2, 10 y 30 μg de proteína/ratón) en grupos de 6 ratones para las dos dosis menores y de 9 ratones para la dosis mayor (30 μg), administradas con adyuvante en las mismas condiciones que en el experimento anterior. Los animales se sangraron a día 22, 41 y 119 p.i., momento en el que fueron anestesiados y sacrificados. Como grupo control se incluyeron 6 animales inmunizados con PBS con adyuvante.

Tal y como se muestra en la tabla 17, todos los animales inoculados con la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r de la proteína presentaron anticuerpos específicos, detectados

mediante ELISA, a día 22 p.i., independientemente de la dosis administrada. Por el contrario, entre los animales inoculados con la forma completa del antígeno, ORF2r, la proporción de animales que presentaron anticuerpos específicos a los 22 d.p.i. varió según la dosis administrada, 33.3%, 50% y 77.8% para las dosis de 2, 10 y 30 µg de proteína/ratón, respectivamente. Cuando en estos grupos de ratones el análisis se realizó con muestras obtenidas a los 41 días de la primera inmunización (11 días tras la tercera inoculación) todos los ratones presentaron anticuerpos específicos, excepto los del grupo inmunizado con la dosis más baja, 2 µg, en el que únicamente fueron detectables en el 83% de los ratones.

Tabla 17. Proporción de ratones inmunizados con diferentes dosis de ORF2r o $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificadas que presentaron anticuerpos específicos frente al VHE a distintos días post-inmunización

PROTEÍNA INOCULADA	DOSIS/RATÓN	Nº RATONES INMUNIZADOS/TOTAL (%)	
		22 d.p.i. (tras 1 dosis)	41d.p.i. (tras 3 dosis)
ORF2r + Adyuvante	2 µg	2/6 (33)	5/6 (83)
	10 µg	3/6 (50)	6/6 (100)
	30 µg	7/9 (77.8)	9/9 (100)
$\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r + Adyuvante	2 µg	6/6 (100)	6/6 (100)
	10µg	6/6 (100)	6/6 (100)
	30 µg	9/9 (100)	9/9 (100)
PBS + Adyuvante	----	0/6 (0)	0/6 (0)

En la figura 34 se muestran los valores de absorbancia en ELISA de los sueros de los ratones en función de la dosis administrada y del número de inoculaciones recibida.

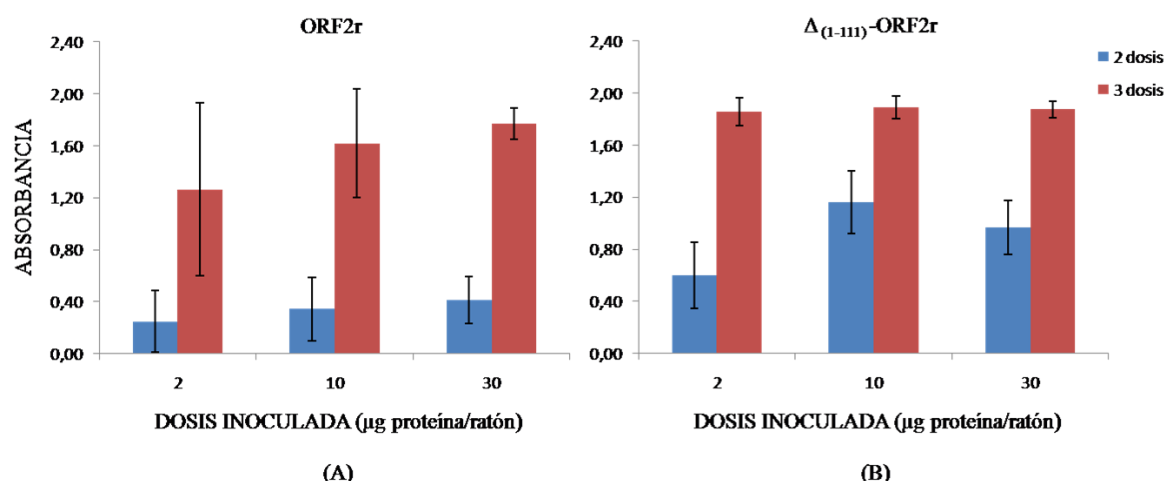


Figura 34. Niveles de anticuerpos específicos (IgG anti-VHE) generados en función de la dosis inoculada y el número de inoculaciones. Los resultados se expresan como valores de A_{495} , generados tras la inmunización con las diferentes proteínas recombinantes ORF2r (A), $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r (B) a las diferentes dosis ensayadas y distinto número de dosis inoculadas.

Los niveles de anticuerpos anti-VHE alcanzados por los ratones inmunizados con ORF2r fueron más elevados a mayor dosis administrada (Figura 34). Por el contrario, en el caso de los animales inmunizados con la forma troncada de la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r los niveles alcanzados fueron similares para las 3 dosis de inmunógeno utilizadas.

En la figura 35 se muestran los niveles de IgG anti-VHE originados en los grupos de ratones inmunizados con las distintas dosis de ambos inmunógenos a lo largo del tiempo.

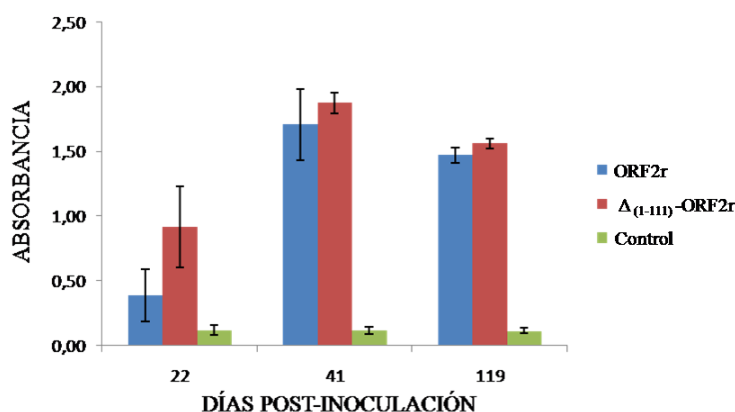


Figura 35. Niveles de anticuerpos específicos (IgG anti-VHE) a lo largo del tiempo. Resultados expresados como valores de Absorbancia A_{495} en ELISA, generados en los distintos grupos de ratones inmunizados con cada uno de los inmunógenos a varios días post inmunización.

Los ratones inoculados con ambas proteínas permanecieron inmunizados hasta el final del experimento (119 d.p.i.). Ninguno de los animales inoculados con PBS presentó anticuerpos específicos.

5.2 Inmunización con los virus vaccinia recombinantes

En paralelo a los experimentos anteriores, se evaluó en el modelo murino la capacidad inmunogénica de los virus vaccinia recombinantes purificados, VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2,

Se inoculó un grupo de 6 ratones con una primera dosis de 10^5 ufp/ratón, seguidas de dos dosis de 10^4 ufp/ratón. Un segundo grupo de 9 ratones se inoculó inicialmente con 10^6 ufp/ratón seguida de dos dosis de 10^5 ufp/ratón. Las inmunizaciones se realizaron intraperitonealmente con los virus diluidos en PBS a intervalos de 15 días. Como control del experimento se inocularon 6 ratones con una dosis de 10^6 ufp/ratón seguida de dos dosis de 10^5 ufp/ratón de virus vaccinia silvestre WR purificado. Los ratones se sangraron antes de ser inoculados y a días 22, 41 y 119 post-inoculación, momento en el que fueron anestesiados y sacrificados. En estos experimentos, la producción de anticuerpos específicos en los ratones inoculados se analizó por ELISA empleando como antígeno las proteínas recombinantes parcialmente purificadas de larvas, de forma que se evitaba la posible detección de anticuerpos frente a proteínas del virus vaccinia que pudieran estar presentes a bajo nivel en los extractos de células infectadas con los virus vaccinia recombinantes.

En la tabla 18 se muestran los datos de inmunización alcanzada por los animales infectados con los diferentes virus. En el caso de los ratones inmunizados con el virus recombinante VV-ORF2 todos los animales presentaron anticuerpos específicos desde la primera inmunización 22 d.p.i., independientemente de la dosis utilizada. Por el contrario, en aquellos animales inmunizados con el virus vaccinia recombinante VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r a la menor dosis, 10^5 ufp/ratón, ningún ratón desarrolló anticuerpos tras la primera inoculación y únicamente en el 66.6% de ellos se detectaron anticuerpos tras la tercera inoculación. Cuando se empleó una dosis mayor de VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, 10^6 ufp/ratón, el 44.4% de los animales resultaron inmunizados tras una sola inoculación, alcanzándose el 100% de ratones inmunizados tras la tercera inoculación.

Tabla 18. Proporción de ratones inmunizados con diferentes dosis de VV-ORF2r o VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r purificados que presentaron anticuerpos específicos frente al VHE a distintos días post-inmunización.

VIRUS INOCULADO	DOSIS (UFP / RATÓN)	N° RATONES INMUNIZADOS/TOTAL (%)	
		22 d.p.i. (tras 1 dosis)	41 d.p.i. (tras 3 dosis)
VV-ORF2	10^5	6/6 (100)	6/6 (100)
	10^6	9/9 (100)	9/9 (100)
VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2	10^5	0/6 (0)	4/6 (66,6)
	10^6	4/9 (44,4)	9/9 (100)
WR	10^6	0/6 (0)	0/6 (0)

En la figura 36 se muestran los valores de absorbancia en ELISA de los sueros de los ratones en función de la dosis administrada y del número de inoculaciones recibido.

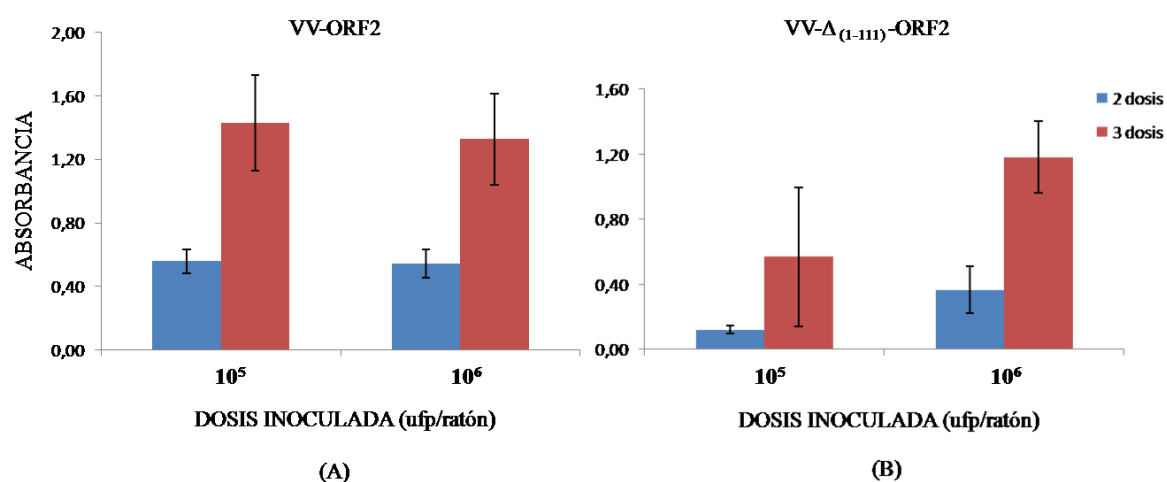


Figura 36. Niveles de anticuerpos específicos (IgG anti-VHE) generados en función de la dosis inoculada y del número de inoculaciones. Los resultados se expresan como valores de Absorbancia A_{495} , generados tras la inmunización con los diferentes virus vaccinia recombinantes purificados VV-ORF2 (A), VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 (B) a las diferentes dosis ensayadas y distinto número de dosis inoculadas.

Tal y como se muestra en la figura 36, mientras que, en los ratones inmunizados con el VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 los niveles de IgG anti-VHE producidos fueron más elevados a mayor dosis inoculada y mayor número de inoculaciones, en los animales inoculados con VV-ORF2, los niveles de anticuerpos específicos fueron similares a las dos dosis empleadas aunque ostensiblemente mayores con tres dosis inoculadas.

Como se puede ver en la figura 38, independientemente de la dosis inoculada, los títulos de anticuerpos más elevados para ambos inmunógenos se alcanzaron tras la tercera inoculación (41 d.p.i.) y se mantuvieron estables hasta el momento del sacrificio, 119 d.p.i., alcanzando en este punto sus niveles más altos. Ningún animal del grupo control inoculado con el virus vaccinia silvestre, WR, presentó IgG anti-VHE a lo largo del estudio.

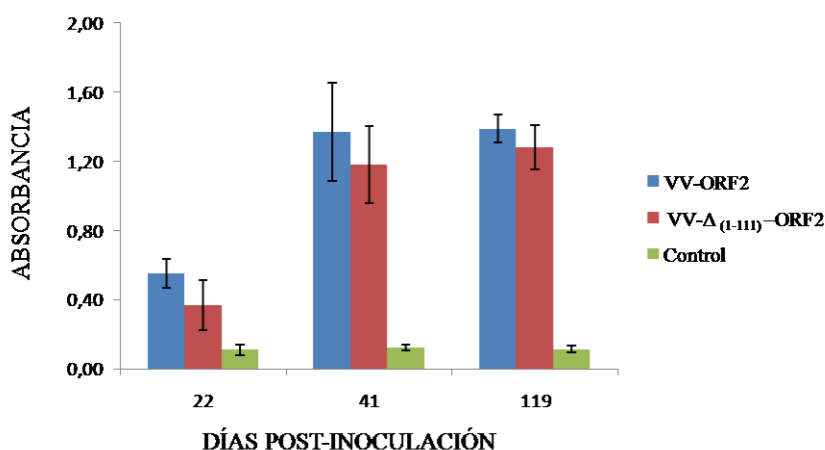


Figura 38. Niveles de anticuerpos específicos (IgG anti-VHE), expresados como valores de Absorbancia en ELISA. Títulos de anticuerpos generados en los distintos grupos de ratones inmunizados con cada uno de los inmunógenos a varios días post- inmunización.

5.3 Estudio de las rutas de transmisión de anticuerpos específicos de madres inmunizadas a sus crías

Una vez confirmado que los antígenos recombinantes expresados en ambos sistemas (baculovirus y virus vaccinia) eran inmunogénicos, se diseñó un experimento para determinar si animales gestantes inmunizados con ellos eran capaces de transmitir la inmunidad a sus crías tanto por ruta intrauterina como a través de la lactancia.

El experimento se diseñó de modo que se inmunizaron dos grupos de 5 ratonas Swiss (blancas) con 3 dosis de 30 μ g de proteína parcialmente purificada (ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r) de extractos de larvas de insecto infectadas con los baculovirus correspondientes y dos grupos de 4 hembras Swiss (blancas) inmunizadas con una dosis inicial de 10^6 ufp, seguida de dos dosis de 10^5 ufp de los virus vaccinia recombinantes (VV- ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2) (Tabla 19). Las condiciones y las pautas de inoculación y sangrado, así como la detección de IgG anti-VHE se llevó a cabo como en los experimentos descritos anteriormente.

Las hembras se preñaron tras la tercera inmunización. En paralelo se preñaron 11 hembras B6D2 (negras) inoculadas con PBS, de esta forma, todas las hembras, inmunizadas o no, parieron en un intervalo de 2 días. En las 24 horas siguientes al parto se intercambiaron parte de las camadas entre las madres, de modo que las ratonas inmunizadas criaron a algunos de sus propios hijos (blancos) y a algunos de los de las madres sin inmunizar (negros) y lo mismo hicieron las madres B6D2 sin inmunizar.

El día del parto y a 3, 9, 18, y 30 días post-parto (d.p.p.) (momento en el que los ratones ya habían sido destetados) se anestesiaron y sacrificaron algunos de los animales criados por las distintas madres para determinar la presencia de IgG anti-VHE en sangre. De esta forma, la presencia de anticuerpos en crías de madres sin inmunizar criadas por madres inmunizadas indicaría la transmisión de anticuerpos a través de la leche de las madres inmunizadas, mientras que la presencia de anticuerpos específicos en crías de madres inmunizadas amamantados por madres sin inmunizar indicaría que la transmisión se había producido por vía intrauterina.

Finalmente, y para descartar que la transmisión por lactancia fuera debida únicamente a la presencia de anticuerpos específicos en el calostro y que, por lo tanto, no estuvieran presentes en la leche mamada con posterioridad, algunas crías de madres no inmunizadas se pasaron con madres inmunizadas a 9 d.p.p. En ningún caso se observaron diferencias con el resto de sus hermanos, por lo que los resultados se muestran en conjunto, independientemente de que los animales hubieran recibido calostro o no.

Además, y con el fin de asegurar que la vía de transmisión intrauterina era eficaz, se practicaron cesáreas en 7 madres, 5 inmunizadas con proteínas recombinantes producidas en larvas (2 con ORF2r y 3 con $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r) y 2 inmunizadas, cada una, con

uno de los virus vaccinia recombinantes, VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 (Tabla 19). Estos animales fueron sacrificados y sangrados en el momento en que se practicaron las cesáreas.

Tabla 19. Resumen de los animales inmunizados implicados en el experimento

INÓCULO	Nº RATONAS	Nº CESÁREAS
ORF2r	5	2
$\Delta_{(1-111)}$-ORF2r	5	3
VV-ORF2	4	1
VV-$\Delta_{(1-111)}$-ORF2	4	1

Como se observa en las tablas 20 y 21 y en la figura 39, independientemente del inmunógeno recombinante utilizado (proteínas obtenidas de larvas de insecto o virus vaccinia), todas las crías de madres inmunizadas amamantadas por ellas mismas, presentaron anticuerpos específicos en sangre desde el día del nacimiento hasta el final del experimento, 30 días tras el parto. Los mismos resultados se obtuvieron con aquellas crías nacidas de madres sin inmunizar que fueron criadas por madres inmunizadas.

Por otra parte, también se detectaron anticuerpos específicos en las crías nacidas de madres inmunizadas que fueron amamantados por madres sin inmunizar. Sin embargo, en el caso de aquellas nacidas de madres inmunizadas con los virus vaccinia recombinantes, el número de crías con IgG anti-VHE en sangre fue menor, observándose que la inmunidad adquirida disminuía con el tiempo, pasando de casi el 90% a 3 d.p.p., a desaparecer por completo 30 días después del nacimiento, mientras que en los animales nacidos de madres inmunizadas con los recombinantes de baculovirus y criados por madres sin inmunizar, se mantuvo en el 100% hasta 18 d.p.p., disminuyendo al 50% a 30 d.p.p. En ningún caso se detectaron anticuerpos específicos frente al VHE en las crías de madres sin inmunizar amamantadas por ellas mismas.

Tabla 20. Porcentaje de crías con anticuerpos anti-VHE nacidos de madres inmunizadas con las proteínas recombinantes ORF2 y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificadas y de madres sin inmunizar criados por sus propias madres y/o por madres adoptivas.

	INMUNÓGENO: PROTEÍNA PURIFICADA	CRÍA	DÍA POST-PARTO				
			0	3	9	18	30
POSITIVOS/TOTAL (%)	MADRE INMUNIZADA	Propia	10/10 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	8/8 (100)
		Adoptada		8/8 (100)	5/5 (100)	4/4 (100)	8/8 (100)
	MADRE SIN INMUNIZAR	Propia	0/5 (0)	0/6 (0)	0/5 (0)	0/7 (0)	0/5 (0)
		Adoptada		4/4 (100)	5/5 (100)	6/6 (100)	2/4 (50)

Tabla 21. Porcentaje de crías con anticuerpos anti-VHE nacidos de madres inmunizadas con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r purificados y de madres sin inmunizar criados por sus propias madres y/o por madres adoptivas.

	INMUNÓGENO: VIRUS VACCINIA	CRÍA	DÍA POST-PARTO				
			0	3	9	18	30
POSITIVOS/TOTAL (%)	MADRE INMUNIZADA	Propia	12/12 (100)	9/9 (100)	5/5 (100)	6/6 (100)	7/7 (100)
		Adoptada		7/7 (100)	7/7 (100)	9/9 (100)	11/11 (100)
	MADRE SIN INMUNIZAR	Propia	0/4 (0)	0/9 (0)	0/5 (0)	0/9 (0)	0/4 (0)
		Adoptada		7/8 (87.5)	4/5 (80)	2/8 (25)	0/5 (0)

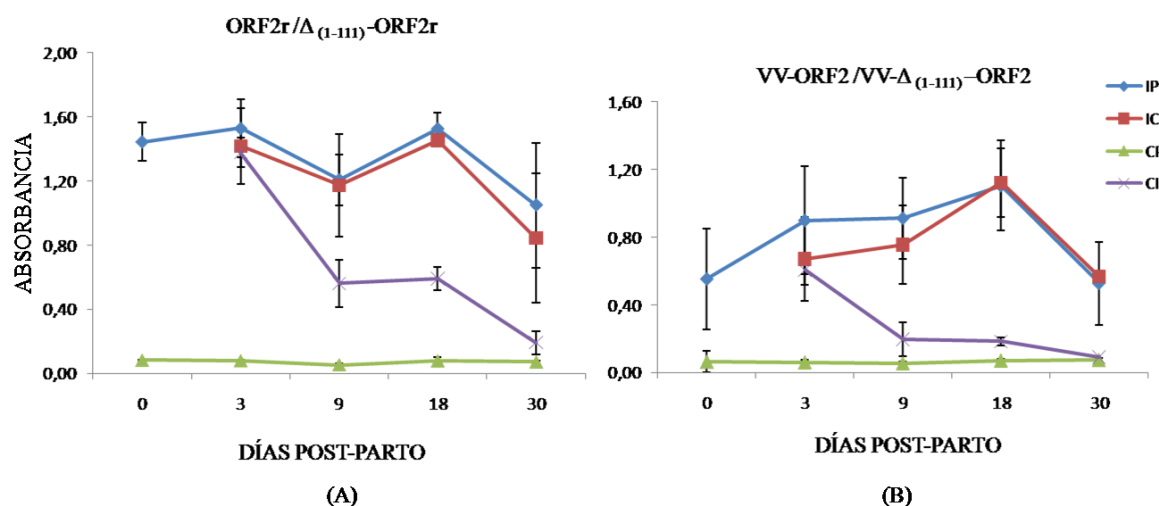


Figura 39. Niveles de anticuerpos presentes en las crías a diferentes d.p.p. Se muestran los valores de A_{495} en ELISA de los sueros del experimento de las rutas de transmisión de anticuerpos de madres inmunizadas con las proteínas recombinantes expresadas en baculovirus (A) y con los virus vaccinia recombinantes (B) a las crías. IP: crías propias de madres inmunizadas, IC: crías de madres control adoptadas por madres inmunizadas, CP: crías propias de madres control, CI: crías de madres inmunizadas adoptadas por madres control.

Como ya se ha comentado, con el fin de descartar que en el estudio de transmisión intrauterina algún animal pudiera haber mamado de su madre inmunizada antes de ser intercambiado con madres adoptivas sin inmunizar, en algunas hembras anestesiadas se practicaron cesáreas. Las crías sacrificadas en el momento de la cesárea y sangradas presentaron, en todos los casos, anticuerpos específicos (Figura 40), confirmando que, efectivamente, la inmunidad se transmite por vía intrauterina.

Tal y como se muestra en la figura 40, las tasas de anticuerpos alcanzados por esta vía en las crías de madres inmunizadas con las proteínas expresadas en baculovirus fueron mayores que los de las crías de madres inmunizadas con los virus vaccinia recombinantes.

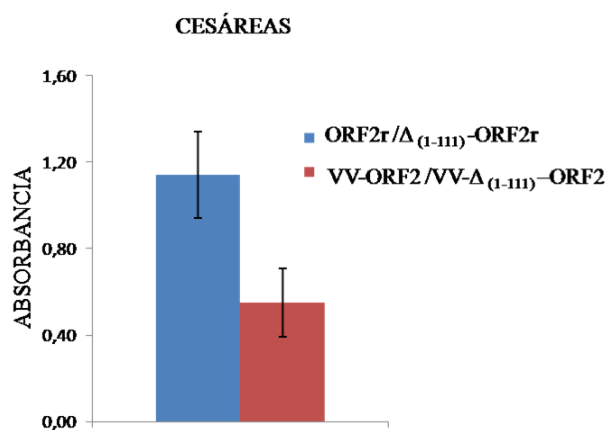


Figura 40. Niveles de anticuerpos en las crías nacidas por cesárea. En algunos casos los sueros analizados correspondían a más de una cría; 31 sueros de 61 animales en el caso de los recombinantes de baculovirus y 3 sueros de 18 animales en el caso de los virus vaccinia recombinantes.

Estos datos indican que las madres inmunizadas transmiten la inmunidad a sus hijos, tanto por vía intrauterina, como por lactancia. Sin embargo, mientras que ambas rutas fueron igual de efectivas en el caso de las madres inmunizadas con los inmunógenos purificados a partir de extractos de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes, no lo fue cuando se utilizaron inmunógenos expresados por virus vaccinia recombinantes. Así, en este último caso, mientras que todas las crías inmunizadas a través de la leche presentaron IgG anti-VHE hasta el final del experimento, 30 d.p.p., en el caso de las crías inmunizadas por vía intrauterina, la inmunidad se perdía con el paso del tiempo, puesto que ningún animal presentaba anticuerpos específicos 30 días después de nacer.

6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Finalmente, como último objetivo de esta tesis, se obtuvieron y caracterizaron anticuerpos monoclonales (AcMo) murinos a partir de la proteína recombinante $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificada de extractos de larvas infectadas con el baculovirus recombinante correspondiente, tal y como se describe en materiales y métodos.

Los clones supervivientes tras el cultivo en medio selectivo se analizaron mediante el ELISA basado en el uso de la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r desarrollado en esta tesis. En

función a los resultados obtenidos se seleccionaron dos clones (2F8 y 4G11) para su caracterización.

El análisis del isotipo de los AcMo mostró que ambos eran IgG1 κ .

Los resultados de la reactividad de los sobrenadantes del cultivo de ambos clones frente a la proteína utilizada para su obtención, $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, testada en ELISA, se muestran en la figura 41A. Resultados equivalentes se obtuvieron con el resto de proteínas recombinantes obtenidas en la tesis, tanto en el sistema de baculovirus, como en el de virus vaccinia (datos no mostrados).

Los AcMo se purificaron por columnas de afinidad a inmunoglobulinas de tipo G como se describe en materiales y métodos y se titularon por dilución límite en ELISA (Figura 41B).

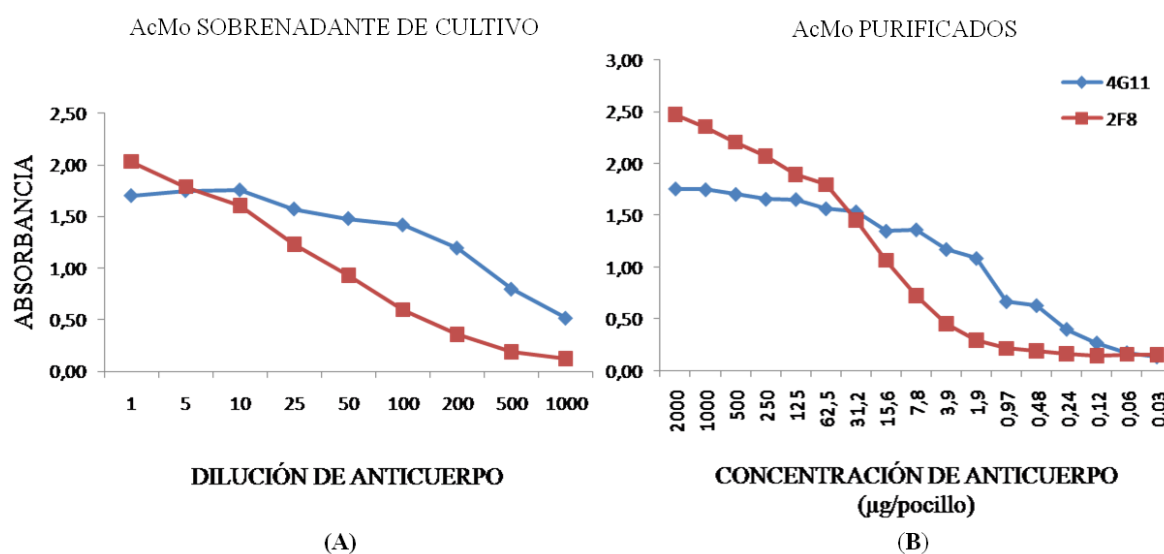


Figura 41. Titulación por dilución límite de la reactividad en ELISA de los AcMo 4G11 y 2F8. Sobrenadantes de cultivo de los clones 2F8 y 4G11 (A) y de los AcMo 2F8 y 4G11 purificados (B). Como antígeno se utilizó proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r, parcialmente purificada de larvas de insecto infectadas con el baculovirus recombinante BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r.

Los AcMo se marcaron con biotina, tal y como se describe en Materiales y métodos. A continuación y para determinar si ambos AcMo reconocían el mismo epítipo, se llevó a cabo un ELISA de competición tal y como se describe en Materiales y métodos.

Como se observa en la figura 42, los AcMo reconocían epítomos distintos presentes en $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r.

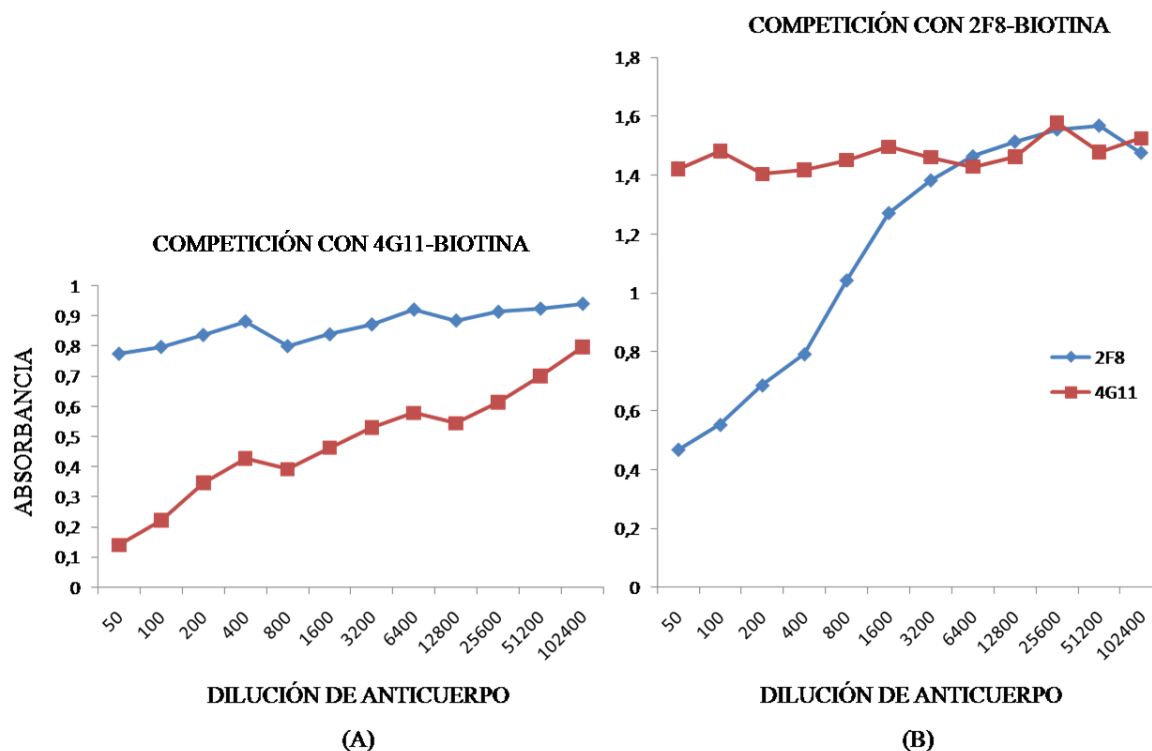


Figura 42. Ensayos de competición entre los AcMo 4G11 y 2F8. Se empleó como antígeno la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificada de larvas de insecto infectadas con el baculovirus BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r. Se muestra la competición del AcMo 4G11 consigo mismo y con el AcMo 2F8 (A) y del AcMo 2F8 consigo mismo y con el AcM 4G11(B). El AcMo 4G11 biotinilado se usó 1:1600 y el AcMo 2F8 biotinilado a 1:200. El sustrato de la biotina, Streptavidina-HRP se usó a 1:1500.

A continuación se ensayó la reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los AcMo en WB. Como se observa en la figura 43, el AcMo 4G11 reconocía en WB las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ ORFr expresadas por los baculovirus recombinantes correspondientes y las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORFr-vv expresadas por los virus vaccinia recombinantes correspondientes, sin que, en ningún caso, se observara reactividad inespecífica en células de insecto infectadas con un baculovirus irrelevante o en células de mamífero infectadas con el virus vaccinia silvestre, WR. El mismo resultado se obtuvo con el AcMo 2F8 (datos no mostrados).

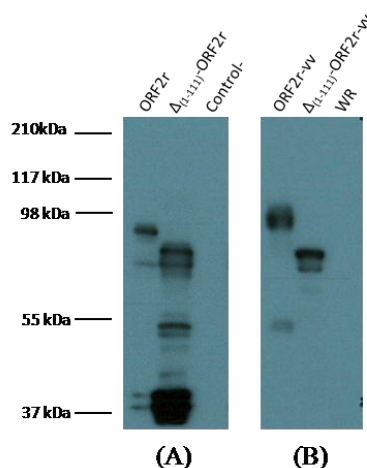


Figura 43. Reactividad del AcMo 4G11 analizada por WB. Se utilizaron como antígeno las proteínas recombinantes ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r expresadas en células de insecto Sf21 infectadas con los baculovirus recombinantes y como control las mismas células infectadas con un baculovirus irrelevante (A). En el panel (B) se muestran los resultados obtenidos al emplear como antígeno las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r-vv expresadas en células de mamífero BSC-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes correspondientes y como control las mismas células infectadas con el virus vaccinia silvestre WR. El AcMo se usó a dilución 1:100 y el anticuerpo secundario anti-ratón-HRP se usó a dilución 1:4000. En el lateral del gel se muestran los marcadores de masa molecular.

Por otro lado, se determinó la utilidad de los anticuerpos monoclonales como herramientas en ensayos de detección mediante inmunofluorescencia. Estos ensayos se llevaron a cabo en células de mamífero, BSC-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2, con el virus vaccinia silvestre WR y sin infectar y con los sobrenadantes de cultivo de los AcMo 4G11 y 2F8.

Como se observa en la figura 44, ambos anticuerpos monoclonales reconocían las proteínas ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r-vv expresadas por los virus vaccinia recombinantes correspondientes, sin que, en ningún caso, se observara reactividad inespecífica en células infectadas con el vaccinia silvestre WR o en las células sin infectar.

Resultados similares se obtuvieron cuando las inmunofluorescencias se llevaron a cabo en células de insecto Sf21 infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, con un baculovirus recombinante irrelevante o sin infectar (Figura 45).

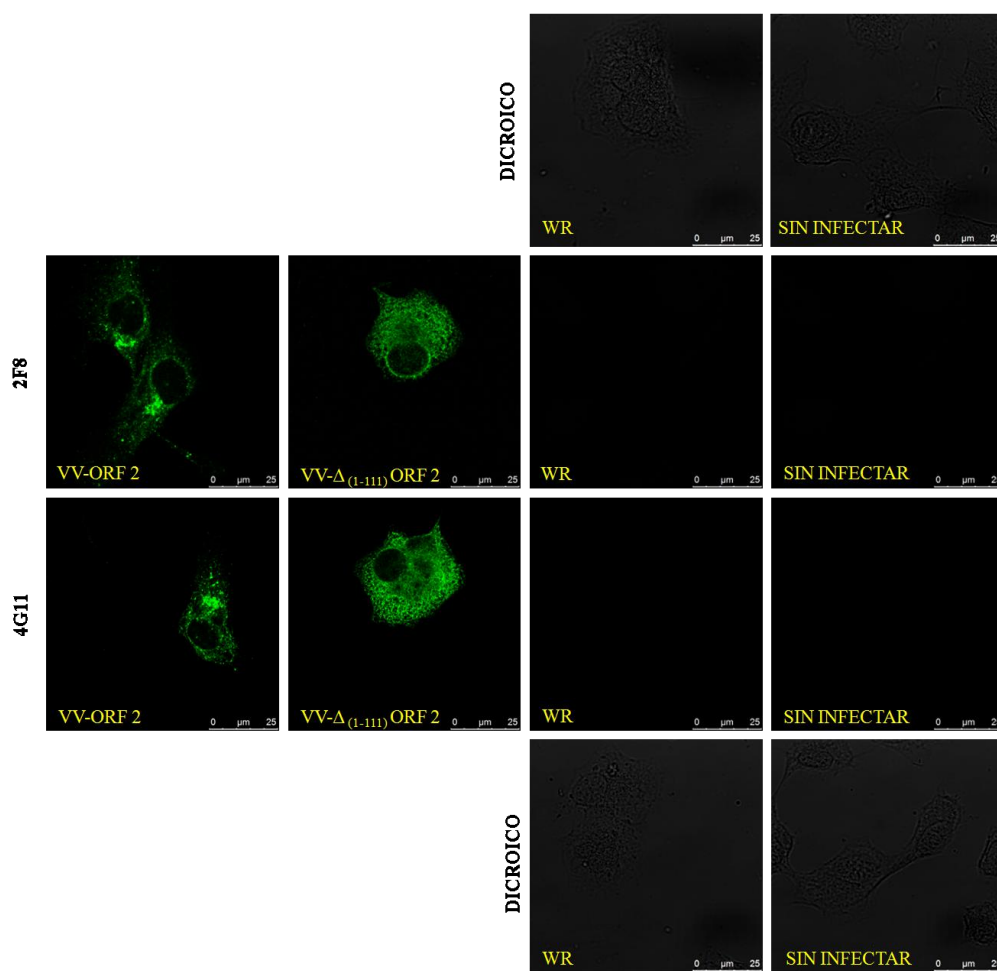


Figura 44. Detección por inmunofluorescencia con los sobrenadantes de cultivo AcMo 2F8 y 4G11 de las proteínas recombinantes del VHE, ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORFr-vv, expresadas en células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes correspondientes. Las células se fijaron con metanol absoluto como se describe en materiales y métodos. Los AcMo se usaron a dilución 1:150 y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-488 se usó a dilución 1:500. En el panel de células infectadas con WR o sin infectar se muestran las células fotografiadas con luz transmitida y óptica Dic.

Finalmente, y para confirmar que la infección con los virus baculovirus o vaccinia no estaba alterando el reconocimiento de las proteínas recombinantes, se ensayó la especificidad de los AcMo generados por las formas proteicas recombinantes del ORF2 del VHE utilizando las dos proteínas de fusión a GFP generadas como se ha descrito con anterioridad. En estas construcciones, la GFP se localiza en el extremo N-terminal de las proteínas. Los estudios se realizaron en células BHK-21 transfectadas con los plásmidos p-GFP-ORF2 y p-GFP- $\Delta_{(1-111)}$ ORF que expresan las proteínas del VHE ORF2 completa y truncada fusionadas a GFP respectivamente, tal y como se detalla en materiales y métodos. Como control se empleó el plásmido de transfección p-GFP-C2 que expresa la GFP.

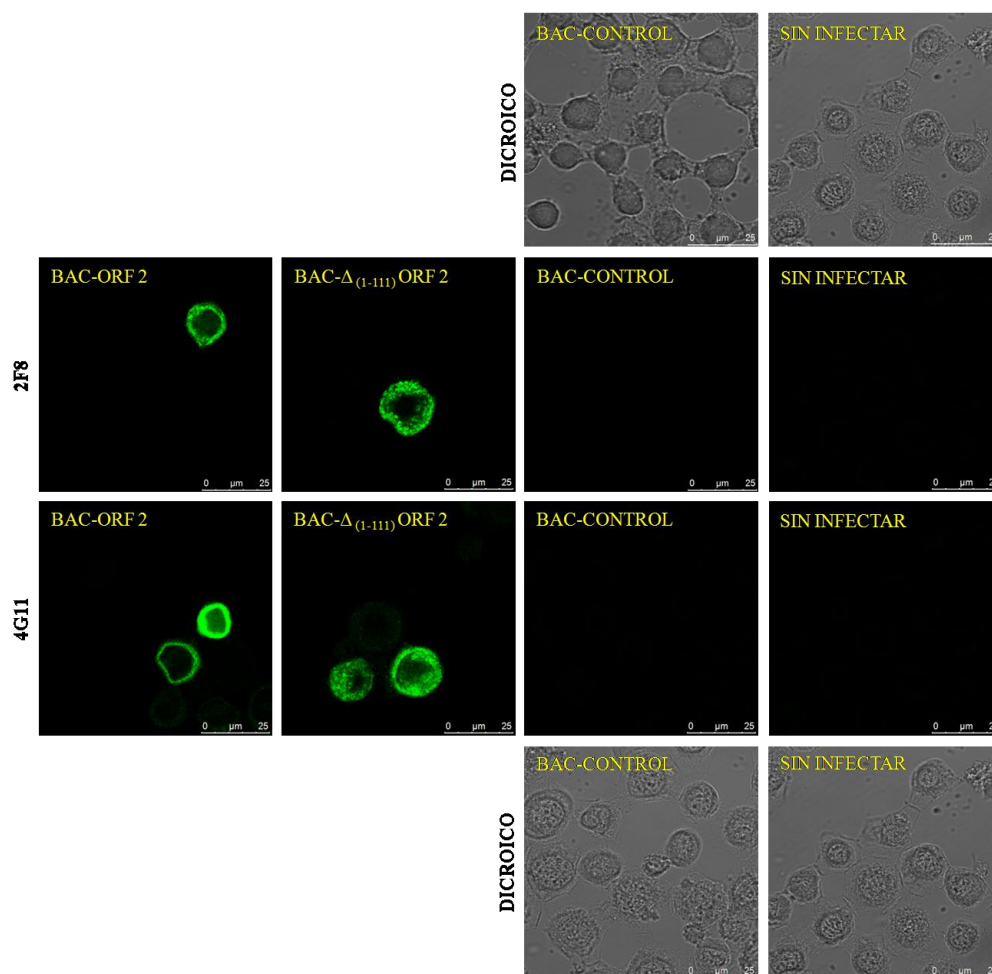


Figura 45. Detección por inmunofluorescencia con los AcMo 2F8 y 4G11 de las proteínas recombinantes del VHE, ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ ORFr, expresadas en células SF21 de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes correspondientes. Las células se fijaron con metanol absoluto como se describe en materiales y métodos. Los AcMo se usaron a dilución 1:150 y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-488 se usó a dilución 1:500. En el panel de células infectadas con el baculovirus irrelevante o sin infectar se muestran las células fotografiadas con luz transmitida y óptica Dic.

Como se muestra en la figura 46, los AcMo fueron capaces de reconocer también ambas proteínas de fusión expresadas en células transfectadas, sin que se observara señal ni en las células transfectadas con el plásmido control, ni en las células sin transfectar.

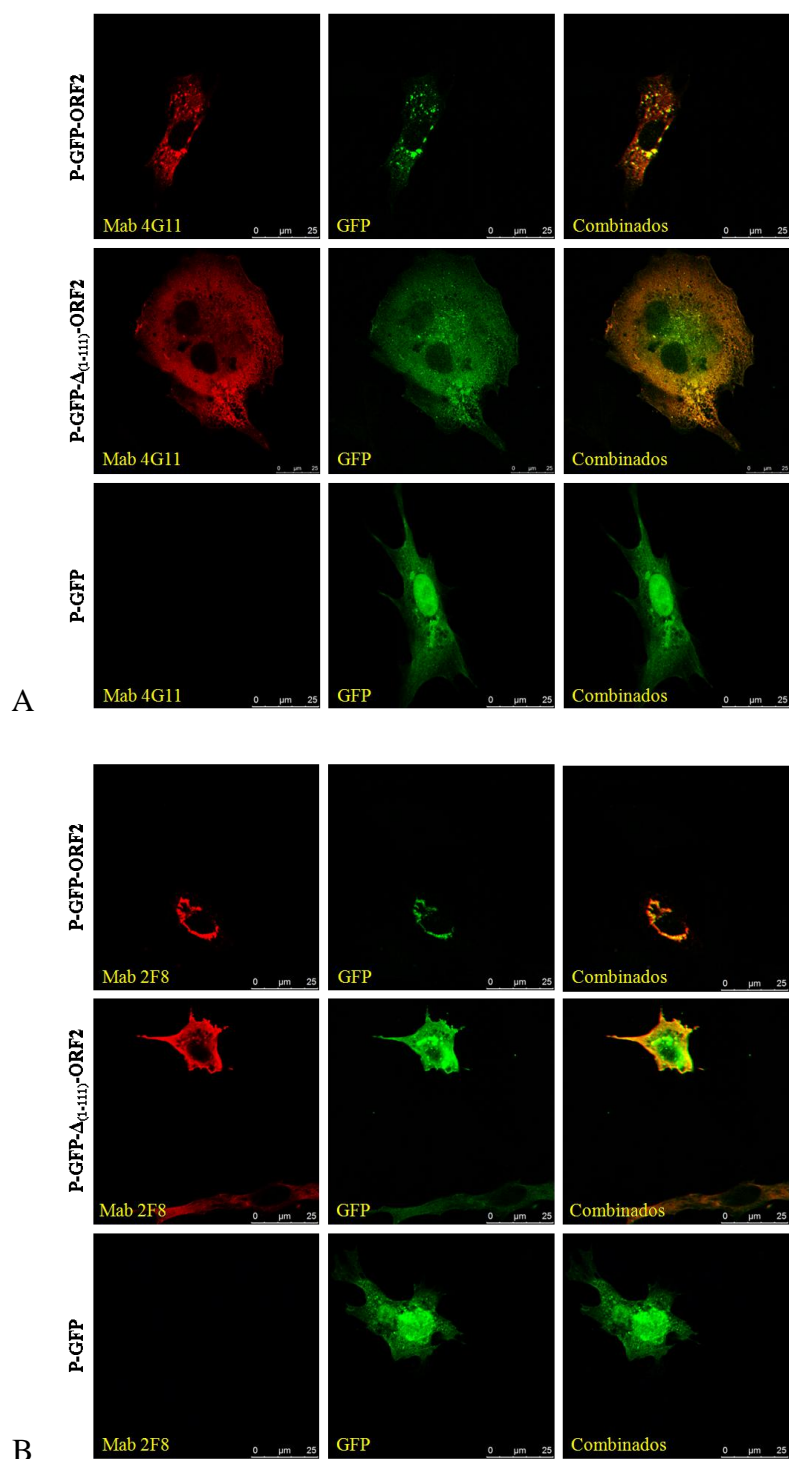


Figura 46. Detección por inmunofluorescencia con los AcMo 4G11 (A) y 2F8 (B) de las proteínas recombinantes del VHE, ORF2r-GFP y $\Delta(1-111)$ ORFr-GFP, en células BHK-21 transfectadas con los plásmidos p-GFP-ORF2, p-GFP- $\Delta(1-111)$ ORF y p-GFP. Las células se fijaron con PFA al 4%, como se describe en materiales y métodos. Los AcMo se usaron a dilución 1:150 y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-594 se usó a dilución 1:500.

Por último, y para mejorar la utilidad de estos anticuerpos en inmunofluorescencia, se conjugaron con un fluorocromo Alexa Fluor-488 como se describe en materiales y métodos, obteniéndose mejores resultados con los AcMo conjugados en inmunofluorescencia ya que se aumentó considerablemente la dilución de uso de los mismos y se redujo el tiempo del ensayo, como se ejemplifica en la figura 47 con el AcMo 4G11-Alexa Fluor-488 y células BHK-21 infectadas con los virus vaccinia recombinantes, el virus vaccinia silvestre WR o células sin infectar. De nuevo, no se observó reactividad con los AcMo conjugados con Alexa Fluor-488 con las células infectadas con WR o sin infectar.

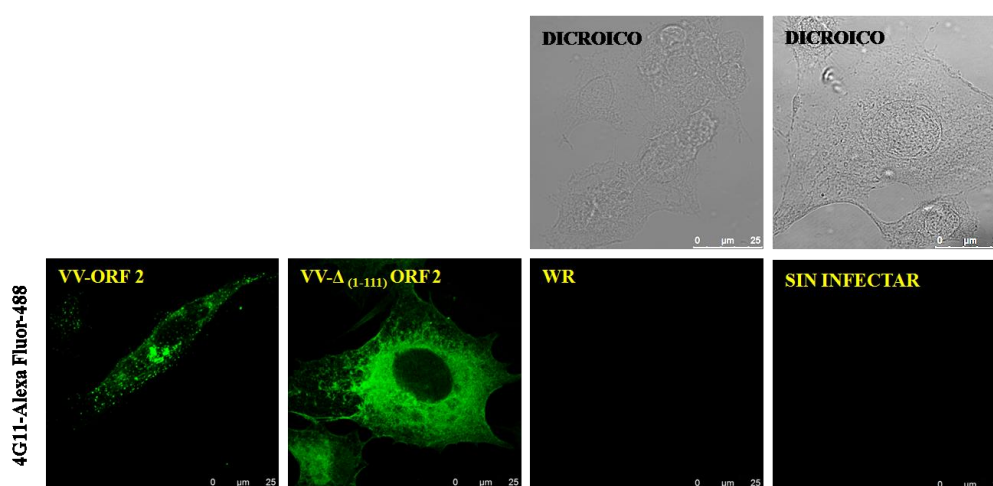


Figura 47. Detección por inmunofluorescencia con el AcMo 4G11 conjugado con Alexa Fluor-488 (4G11-Alexa Fluor-488) de las proteínas recombinantes ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ ORFr-vv, expresadas por los vaccinias recombinantes correspondientes. Las células se fijaron con metanol absoluto como se describe en materiales y métodos. El AcMo 4G11-Alexa Fluor-488 se usó a dilución 1:300. En el panel de células infectadas con WR o sin infectar se muestran las células fotografiadas con luz transmitida y óptica Dic.

DISCUSIÓN

El VHE es un patógeno de transmisión entérica responsable de grandes brotes epidémicos en áreas donde las condiciones sanitarias y de abastecimiento de aguas no son las adecuadas, en las que se considera endémico (180). Hasta la fecha y basándose en la similitud de sus secuencias genómicas, el VHE se ha clasificado en 4 genotipos, de los cuales los genotipos I y II son los principales responsables de las epidemias descritas en países en vías de desarrollo (13, 164). En los países industrializados, incluyendo España, los casos de hepatitis E siempre se habían relacionado con viajes a zonas endémicas. Sin embargo, en los últimos años se están describiendo más casos humanos autóctonos originados por virus de genotipo III (17, 29-31, 36, 61, 146, 177, 178, 194, 196, 200, 201). Aunque el origen de estos casos autóctonos no se ha esclarecido todavía, se postula que pueden ser zoonótico. A ello ha contribuido la detección de marcadores de infección por el VHE (ARN y anticuerpos específicos) en animales domésticos (cerdos principalmente) y silvestres (jabalíes y ciervos, entre otros), además de la elevada similitud genómica encontrada entre cepas porcinas y humanas de genotipos III y IV de una misma región geográfica. De hecho, se han detectado virus infecciosos en hígados en venta en mercados europeos y americanos (25, 64) y se ha demostrado la infección en humanos por ingesta de carne de ciervo e hígado de cerdo crudo o poco cocinado (225, 252). Todos estos hechos han tenido como consecuencia el incremento, en los últimos años, del estudio de los diversos aspectos relacionados con el VHE

Cuando se comenzaron los trabajos experimentales de esta tesis los datos sobre el VHE y las herramientas específicas para su estudio eran escasas. Por ello, antes de poder analizar adecuadamente la incidencia de la infección por el VHE en la cabaña porcina española, hubo que desarrollar una serie de herramientas y técnicas específicas que no estaban disponibles.

1. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA (ORF2) DEL VHE

La proteína de la cápsida del VHE, ORF2, es la más inmunogénica del virus (221) por lo que la mayoría de los sistemas de diagnóstico desarrollados hasta la fecha se basan en el uso de esta proteína, o péptidos recombinantes de ella, expresados desde diferentes sistemas biológicos, tales como bacterias recombinantes (171, 244, 262), virus

recombinantes (33, 83, 87, 135, 136, 191, 205, 262) y vectores de expresión eucariota (104).

a) El sistema de baculovirus

El sistema de baculovirus se lleva empleando desde hace mucho tiempo como vector de expresión de proteínas dada su versatilidad, fácil manejo y relativo bajo coste (207). Además, la confirmación de la utilidad de larvas de *Trichoplusia ni* como biofactorías relativamente sencillas de crecer y manipular, económicas y con un gran rendimiento, hizo que, inicialmente, fuera el sistema seleccionado para el trabajo a desarrollar. De hecho, ya se había descrito (262) que, en el caso del VHE, las inmunoglobulinas inducidas reconocen mejor las proteínas expresadas en este sistema que en bacterias, posiblemente como consecuencia de una mayor exposición de epítomos específicos (262).

A la vista de estos antecedentes, se generaron dos baculovirus recombinantes. Uno de ellos expresa la proteína ORF2 completa del VHE de genotipo III y el otro una forma truncada de ésta, que carece de los primeros 111 aminoácidos. Esta forma truncada aparece de forma espontánea cuando la forma completa se expresa en cultivos de células de insecto Sf9 (262) y es capaz de ensamblarse por sí misma y formar partículas similares a los viriones (VLP) inmunoreactivas en cultivos de células de insecto Tn5 (135, 136).

Células Sf21 de insecto

La proteína ORF2r completa expresada en células de insecto Sf21 aparece como una forma proteica mayoritaria con un tamaño aparente de unos 78 kDa, así como otras especies de menor tamaño, 65-68 kDa. Con base en su composición aminoacídica su tamaño teórico sería de 72 kDa. Estas diferencias de tamaño observadas se pueden deber a diversos factores, como la inclusión de una cola de histidinas en la proteína recombinante, la inexactitud del sistema de estimación de tamaño molecular (WB), así como a posibles fenómenos de glicosilación sufridos por la proteína. En cualquier caso, se ha descrito que ORF2 se sintetiza como un precursor glicoproteico de alrededor de 82 kDa, que posteriormente se procesa para dar la proteína madura de unos 72 kDa, y que tiene tres sitios potenciales de glicosilación, pudiendo llegar a presentar un tamaño de 88 kDa (104, 221, 254). Sin embargo, no parece que sea este el caso de ORF2r en el sistema de células de insecto utilizado, ya que, tal y como se discute más adelante, los ensayos con

tunicamicina sugieren que la proteína no se glicosila o que, al menos, esta no es del tipo N-glicosilación. En cualquier caso, cuando la proteína ORF2 de genotipo I se ha expresado en diferentes líneas celulares de insecto (Sf21, Sf9, Tn5) se han descrito un abanico de especies proteicas cuyos tamaños oscilan entre los 30 y los 100 kDa (83, 87, 135, 136, 191, 205, 262). Las otras especies de menor tamaño e intensidad observadas (65-68 kDa) son, muy probablemente, productos del procesamiento natural de la forma completa, para la que ya se ha descrito su truncamiento en la región de los primeros 111 aminoácidos en otras líneas celulares (262). Los datos de la cinética de expresión de esta proteína en las células Sf21 observados en este trabajo confirman esta hipótesis, puesto que el aumento en la proporción de las especies de menor tamaño es paralelo a la disminución de la proteína mayoritaria, claramente predominante a tiempos tempranos post infección.

Por su parte, la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r expresada en células de insecto Sf21 aparece como un doblete mayoritario de 65-68 kDa, similar al observado cuando se expresa la forma completa, además de alguna otra banda minoritaria. Con base en su composición aminoacídica su tamaño teórico sería de 59 kDa. De nuevo, este diferente tamaño observado podría deberse a los mismos factores mencionados anteriormente. Sin embargo, como se comenta más adelante, en este caso sí se observaron diferencias en su movilidad tras el tratamiento con tunicamicina lo que sugiere que, al contrario que ORF2r, la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r sí sufre fenómenos de N-glicosilación en el sistema empleado. En cualquier caso, de nuevo, el tamaño descrito para esta forma truncada de la proteína del genotipo I expresada en diferentes líneas celulares de insecto (Sf21, Sf9, Tn5) varía entre 50 y 62 kDa (135, 136, 205, 262).

La cantidad de proteína obtenida de los extractos de células infectadas siempre fue mayor en el caso de la forma truncada que en la forma completa debido, muy probablemente, a que esta última se encuentra fuertemente asociada a componentes celulares, como ya se ha descrito para otras líneas celulares de insecto, Sf9 y Tn5, con proteínas recombinantes de otros genotipos (83, 87, 136).

Larvas de insecto (*Trichoplusia ni*)

La expresión de las proteínas ORF2r completa y de la forma truncada $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r en larvas de insecto de *Trichoplusia ni* dio lugar, en ambos casos, a un doblete de un tamaño relativo de unos 62-65 kDa, similar al observado cuando se expresa la forma truncada en las células de insecto y a las especies minoritarias observadas al expresar la

forma completa. Ésta es la primera vez que la forma completa de ORF2 se expresa en un sistema larvario, y el tamaño detectado se debe, muy probablemente, al truncamiento de los 111 primeros aminoácidos del N-terminal, dada la similitud de los tamaños de estas especies con los observados en el sistema celular. Actualmente se desconocen cuáles son los mecanismos implicados en el procesamiento de ORF2, pero se ha postulado que pueden estar mediados tanto por proteasas del baculovirus (262) como de las células hospedadoras (136, 262).

El tamaño observado para la forma truncada nuevamente fue mayor al esperado teóricamente, probablemente debido a los factores comentados con anterioridad incluyendo su capacidad de glicosilación, tal y como se ha observado previamente con una proteína similar de genotipo I (205).

En el sistema larvario utilizado se observó una mayor cantidad de especies proteicas de menor tamaño que, como en el caso anterior, probablemente representen productos de degradación o intermedios madurativos. En cualquier caso, estas especies son específicas, puesto que reaccionan con los sueros positivos para IgG de cerdo y humano. Algunos son aparentemente productos del truncamiento en la región N-terminal, puesto que son reconocidas por anticuerpos anti-His, lo que indica que estas especies mantienen las colas de Histidinas incorporadas al extremo C-terminal de la proteína de fusión recombinante producida.

b) El sistema de vaccinia

Como segundo sistema de expresión se utilizó el virus vaccinia, empleado frecuentemente para la expresión de proteínas recombinantes (20, 137, 170, 224).

De manera análoga a lo realizado en el sistema de baculovirus, se obtuvieron dos virus vaccinia recombinantes que expresan la forma completa de ORF2 y su forma truncada, respectivamente. Seguidamente, se comparó su expresión y aplicabilidad con la de las proteínas generadas en el sistema de baculovirus.

La expresión de la proteína ORF2r-vv en células de mamífero BSC-1 o BHK-21 origina una serie de proteínas cuyas masas moleculares se sitúan entre los 80 y los 90 kDa. En este sistema, el tamaño observado es mayor que el teórico y que el observado aquí en el sistema de baculovirus. Además de los factores mencionados antes y de la inclusión de un epítipo Myc adicional en la proteína de fusión, en este sistema de expresión también se

observaron procesos de N-glicosilación cuando los extractos proteicos fueron tratados con tunicamicina (ver más adelante). Por otro lado, el único trabajo en el que se ha expresado la proteína ORF2 completa de genotipo I utilizando el sistema del virus vaccinia describe un tamaño de 71 kDa en extractos de células TK-143B infectadas (33).

Por su parte, la expresión de la forma truncada $\Delta_{(1-111)}\text{ORF2r-vv}$ dio lugar a un doblete de entre 60 y 62 kDa, el cual, teniendo en cuenta la cola de His y el epítipo Myc que se le habían incorporado, es similar al tamaño teórico esperado. Estos resultados se ven apoyados por la ausencia de N-glicosilación, puesta de manifiesto en los experimentos desarrollados que se comentan a continuación. En cualquier caso, de nuevo, el tamaño descrito para este tipo de proteínas en los diversos sistemas celulares utilizados es bastante variable (135, 136, 205).

Con el sistema de virus vaccinia la cantidad de forma completa y truncada expresada fue similar, lo que indica que en células de mamífero la forma completa no se encuentra tan asociada a componentes celulares como en los sistemas basados en insectos, o bien que los procesos usados para su extracción son más efectivos.

En este sistema también se observó el truncamiento de la forma completa, aunque en menor medida que en el sistema de baculovirus.

1.1 Estudio comparativo de los patrones de glicosilación de las proteínas recombinantes del VHE expresadas en el sistema de baculovirus o en el del virus vaccinia

Dada la importancia que los procesos de glicosilación pueden tener en la correcta expresión de proteínas en sistema heterólogos, desde su correcto plegamiento hasta su transporte y la influencia de ello sobre las características antigénicas e inmunogénicas de las mismas, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de N-glicosilación que presentaban las proteínas recombinantes expresadas en los distintos sistemas empleados, mediante el uso de un inhibidor de la N-glicosilación.

Los experimentos relatados anteriormente mostraron que en ambos sistemas una de las dos formas de ORF2 expresada estaba glicosilada, pero, inesperadamente, en cada sistema la forma glicosilada era distinta, el ORF2 completo en el caso del virus vaccinia y la forma truncada en el caso de baculovirus. Hasta ahora, el único estudio publicado relativo a la glicosilación de ORF2 en larvas de insecto indica que la infección de larvas *S.*

litura con un recombinante que expresa la forma truncada produce una proteína glicosilada (205).

En todos los estudios realizados hasta la fecha en células de mamífero transfectadas con vectores de expresión (73, 104, 212, 254), infectadas con el replicón del virus del bosque de Semliki (SFVr) (230) o mediante transcripción *in vitro* (73, 104, 254), la proteína ORF2 se expresa en forma glicosilada, hallándose en algunos casos, simultáneamente formas de ORF2 no glicosiladas. Únicamente en un trabajo se describen formas únicas no glicosiladas (73). En nuestro estudio, al igual que en el primero que describió la presencia de tres sitios potenciales de N-glicosilación (104), la forma truncada expresada en células Sf21 de insecto aparece glicosilada y presenta, al menos, tres formas de movibilidades distintas. Un patrón similar se observó en la forma completa expresada en el sistema del virus vaccinia.

La posible función de la glicosilación de la proteína ORF2 y el orgánulo celular en el que ésta ocurre han sido objeto de diversos estudios. Así, se ha descrito que la glicosilación tiene lugar en el RE (212, 254), dado que ORF2 posee una secuencia correspondiente a un péptido señal de direccionamiento a retículo (254). Sin embargo, otros trabajos han propuesto que la localización en el RE es en realidad un artefacto de su sobreexpresión en los sistemas celulares empleados y que su posible glicosilación sería a través de tres de sus regiones aminoácidas cuya composición es similar a las secuencias sequon¹ de glicosilación (73, 230). En favor de esta última hipótesis está el hecho de que la proteína ORF3 reacciona de forma preferente con la forma no glicosilada de ORF2 (235) y que la acumulación de ORF2 en el citosol es preferentemente en forma no glicosilada, de modo que esta forma sería más estable en células de mamífero (230). De hecho, los virus que carecen de envuelta no suelen tener proteínas glicosiladas, salvo excepciones como los Rotavirus (62). A pesar de lo expuesto, también se ha propuesto que la localización citoplásmica de ORF2 depende de su capacidad de retrotranslocarse desde el RE, la cual depende de que ORF2 esté glicosilada (212), dado que se ha observado que a medida que aumenta la forma citosólica no glicosilada disminuye la forma glicosilada del RE, lo que viene refrendado por la acumulación de proteína no glicosilada que, con el tiempo, se observa en el citosol.

(1) **Sequon:** secuencia consenso para N-glicosilación. Estas secuencias son de tres aminoácidos: Asn-X-Ser ó Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro.

Sorprendentemente, la expresión de ambas proteínas en los dos sistemas empleados mostró que únicamente una de las formas proteicas sufría procesos de N-glicosilación, la truncada en el sistema de baculovirus y la completa en el del virus vaccinia. Ambas formas poseen las secuencias sequon características de fenómenos de glicosilación. Sin embargo, el péptido señal de direccionamiento al RE no está presente en la forma truncada y, a pesar de ello, se glicosila en el sistema de baculovirus. Dado que desconocemos la localización celular de las proteínas expresadas en el sistema de baculovirus no podemos discernir si la forma truncada es capaz de alcanzar el RE, a pesar de carecer del péptido señal de direccionamiento a él y si la forma completa no se localiza en el RE, a pesar de conservar el péptido señal o si en este sistema celular la glicosilación de estas proteínas tiene lugar en el complejo de Golgi, al que sólo tendría acceso la forma truncada.

Por otra parte, las proteínas expresadas en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes se localizan en el RE (ver a continuación), uno de los orgánulos de glicosilación de las células. Aún así, en los experimentos realizados, sólo se observaron procesos de N-glicosilación en la forma completa, ORF2r-vv, que en células infectadas con el virus vaccinia recombinante se acumula de forma preferente en el Golgi. Este hecho podría explicar los diferentes patrones observados en ambas proteínas

Con el fin de discernir entre las diversas posibilidades se está planificado un estudio mediante el tratamiento de células infectadas con fármacos que provocan alteraciones en el complejo de Golgi. En cualquier caso, no se puede descartar que las proteínas recombinantes adquieran un plegamiento que no haga accesibles los sitios de glicosilación, o que éstas, de producirse, sean de naturaleza distinta a las N-glicosilaciones.

1.2 Estudio de la localización celular de las proteínas recombinantes en células de mamífero infectadas con los virus vaccinia recombinantes

La ausencia de un sistema de cultivo celular para el VHE ha originado que el estudio de la localización de las proteínas y enzimas víricas se realice en sistemas de expresión heterólogos, por lo que los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela, al no mimetizar necesariamente el proceso natural.

En este trabajo se emplearon dos líneas celulares de mamífero, BHK-21 y BSC-1, para estudiar la expresión y la localización celular de las proteínas tras la infección con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2 mediante microscopía de fluorescencia convencional y confocal.

Los datos obtenidos indican que en el sistema empleado, la proteína ORF2r-vv completa se localiza tanto en el complejo de Golgi, donde se acumula con niveles de expresión muy altos, como en el RE, tal y como se observó al utilizar un anticuerpo anti-C-Myc, o los anticuerpos monoclonales anti- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r generados en esta tesis.

Estudios previos de inmunofluorescencia en células permeabilizadas y sin permeabilizar, indicaban que la proteína ORF2 se localiza tanto en la superficie celular como intracelularmente (73, 104, 235, 254). Los datos obtenidos en esta tesis en células no permeabilizadas confirman que la forma completa ORF2r-vv también se localiza en la superficie de la célula, tal y como se ha descrito previamente (104, 254).

Por otro lado, varios trabajos han descrito también que la forma glicosilada, o sin glicosilar, de ORF2 se localiza tanto en citosol, al cual accedería tras ser retrotranslocada desde el RE mediante un proceso que depende de que la proteína esté glicosilada, como asociada a membranas (212, 230, 231). Mediante microscopía confocal se ha descrito que tras la transfección de un transcrito de la proteína ORF2 de genotipo I en células S10-3 ésta presentaba una localización citoplasmática, no observándose colocalización cuando se utilizaban marcadores del RE o del Golgi (73). Así pues, los datos publicados hasta la fecha no son concluyentes, habiéndose propuesto que ORF2 tiene una localización en superficie, pero también citoplasmática.

Además, y si bien es cierto que debido a que ORF2 posee residuos ricos en manosa, se ha postulado (104) que esta proteína muy probablemente debería de circular por Golgi, lugar en el que es más frecuente que se incorpore este tipo de azúcar, tal hecho no se había observado hasta la fecha, de modo que los datos obtenidos en esta tesis son los primeros que describen la localización de ORF2 en el complejo de Golgi.

La localización de la forma truncada de ORF2 en células de mamífero nunca había sido abordada con anterioridad. Los datos obtenidos en esta tesis muestran que la proteína $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r-vv posee una localización característica y uniforme de RE. Una primera aproximación para explicar este hecho sería la presencia de un posible péptido señal de direccionamiento al RE en su región N-terminal, sin embargo, la forma truncada de esta proteína carece de dicho péptido y también se localiza en RE. La translocación de las proteínas en el RE puede ocurrir, al menos, por dos vías distintas: una dependiente de una partícula de reconocimiento del péptido señal (SRP) y otra independiente de ella (163). Por tanto, $\Delta_{(1-111)}$ ORF2r-vv podría acceder al RE debido a la presencia de otras secuencias de

direccionamiento no identificadas aún, o a la presencia de una región hidrofóbica que se localiza próxima al C-terminal y que podría provocar la asociación de la proteína recién sintetizada a las membranas del RE. En cualquier caso y como se ha discutido en el caso de la forma completa, no se puede descartar que la proteína truncada interaccione con proteínas celulares o del virus vaccinia utilizado para su expresión, las cuales serían las encargadas de transportarla hasta el RE. La hipótesis de que las dos formas recombinantes de la proteína se localicen en el RE viene también apoyada por la observación de que ambas son capaces de interaccionar con el extremo 5' del ARN del VHE (213), así como por el hecho de que la replicasa viral también se localiza en el RE (186).

El estudio de la localización de esta proteína en células no permeabilizadas ha mostrado la ausencia de la misma en la superficie celular, algo que era de esperar, ya que carece de la región N-terminal, que es la única que posee características hidrofóbicas que le permitan asociarse a membranas.

En definitiva, y con las precauciones propias que conllevan este tipo de estudios en sistemas heterólogos, nuestros datos apuntan a una localización de ORF2 completa preferentemente en Golgi, pero también en RE y superficie celular, mientras que la forma truncada se acumularía mayoritariamente en RE.

2. DESARROLLO DE SISTEMAS DIAGNÓSTICOS BASADOS EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GENERADAS

El endemismo que el VHE presenta en áreas donde las condiciones sanitarias y de abastecimiento de aguas no son las adecuadas y la aparición de brotes epidémicos en las mismas; así como el incremento de casos reportados en Europa, incluyendo España, en los últimos años, han puesto de manifiesto la necesidad de disponer de herramientas diagnósticas fiables (4, 57, 96, 126, 127, 157, 247). Con este fin, se han venido desarrollando una serie de sistemas de detección de ARN del VHE y de anticuerpos específicos frente a él. En este último caso, ya hay disponibles algunos estuches comerciales, así como varios sistemas desarrollados en diversos laboratorios alrededor del mundo, que se basan en el uso de ORF2 y/o ORF3 recombinantes expresadas en sistemas heterólogos (4, 57, 96, 126, 127, 157, 247). A pesar de ello, se ha puesto de manifiesto que, en algunos casos, estos sistemas no son capaces de detectar infecciones causadas por virus de genotipo III, prevalente en Europa (88). A ello hay que añadir que los estuches están

diseñados para su uso en humanos y no en cerdos, que mayoritariamente se infectan por virus de genotipo III y que por lo tanto, necesitan ser modificados para su uso en estos animales, sin mencionar su elevado coste. Todos estos datos señalaban la necesidad de disponer de mejores sistemas diagnósticos. Con este fin se analizó la capacidad de las proteínas recombinantes generadas para la puesta a punto y validación, por primera vez, de sistemas de ELISA basados en proteínas de genotipo III y utilizables con sueros de especies distintas.

Los resultados obtenidos han demostrado que las proteínas recombinantes generadas con los virus vaccinia y los baculovirus, en cultivos celulares o en larvas de insecto, son excelentes antígenos para ser empleados con fines diagnósticos con sueros porcinos y humanos, en el caso de los antígenos generados en baculovirus. Todas ellas presentan una elevada especificidad y sensibilidad.

La concordancia entre los resultados de detección de IgG en sueros porcinos mediante ELISA en los que se usaron ambas formas de ORF2, completa y truncada, fue ligeramente menor, 94.5%, con las de vaccinia que con las de baculovirus, 99% en las de células y 100% en las de larvas. Los resultados de los antígenos de células y larvas con sueros humanos fueron semejantes. Los casos discordantes con sueros porcinos siempre fueron positivos en ELISA con los antígenos producidos en el sistema de insectos. El hecho de que estos sueros reconozcan en WB los antígenos de ambos sistemas sugiere que el plegamiento de la proteína es distinto, de manera que algunos epítomos quedan enmascarados cuando son expresados en vaccinia.

Por otro lado, el reconocimiento similar observado con ambas formas de la proteína confirma los datos publicados por otros grupos (136, 244) indicando que los sueros de personas y animales convalecientes de una infección con el VHE reaccionan mayoritariamente contra epítomos localizados en el extremo carboxilo de la proteína, el cual está presente en las dos formas de ORF2 obtenidas en esta tesis. En cualquier caso y de acuerdo con lo observado en otros trabajos (83, 87, 136), la forma completa obtenida es aparentemente menos soluble, puesto que queda retenida en los extractos celulares de insecto más que la truncada y, por lo tanto, es esta última la que presenta mejores condiciones como candidato antigénico de uso diagnóstico. En el caso del virus vaccinia la producción de ambas formas determinada por WB es aparentemente similar, pero la especificidad de la forma truncada es mayor. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las observadas en este trabajo, tanto en la localización celular de las proteínas, como

en los procesos de glicosilación que sufren y las consecuentes variaciones en el plegamiento y exposición de epítomos. Experimentos para clarificar estos aspectos se están llevando a cabo en el laboratorio.

Una de las ventajas del uso del sistema de baculovirus para la expresión de antígenos es su relativa facilidad de manejo y su bajo coste. Ambas cualidades se ven potenciadas cuando se utilizan larvas de insecto como biofactorias en lugar de cultivos celulares. Los cálculos realizados con los datos obtenidos en esta tesis utilizando las condiciones idóneas puestas a punto para cada una de las proteínas ensayadas lo confirman. El rendimiento en cultivo celular estimado a partir de la infección de $9-12 \times 10^6$ células (crecidas en 75 cm² de superficie) fue suficiente para realizar hasta 12000 determinaciones individuales, mientras que el rendimiento obtenido a partir de 1 larva permite el análisis de entre hasta 6600 o 23000 determinaciones, dependiendo de que el antígeno sea la forma completa o la troncada, respectivamente. En el caso del sistema de vaccinia este rendimiento es menor, pudiendo llegar a realizarse entre 1500 o 7500 determinaciones individuales en ELISA dependiendo de que el antígeno empleado sea la forma completa o troncada, respectivamente.

Aunque la mayoría de los sueros testados en este estudio pertenecían a genotipo III, los sistemas desarrollados también fueron capaces de detectar los pocos sueros humanos y porcinos testados procedentes de infecciones por virus de genotipo I y IV, respectivamente. Aunque la efectividad de este tipo de ensayos para su aplicación en humanos en condiciones de baja endemidad se ha puesto en entredicho (88), y a la espera de poder ensayar un mayor número de muestras, el sistema desarrollado en este estudio podría ser válido en tales circunstancias.

En conclusión y, si bien los antígenos obtenidos en todas las condiciones testadas se han mostrado eficaces en el reconocimiento de anticuerpos IgG anti-VHE en suero, las formas expresadas en el sistema de baculovirus presentan una mayor sensibilidad, un mayor rendimiento a menor coste y pueden usarse con sueros humanos y porcinos. De entre ellas, la forma troncada parcialmente purificada a partir de larvas infectadas es el antígeno que mejores prestaciones presentó para su posterior utilización en estudios epidemiológicos.

3. VALIDACIÓN DEL ELISA DESARROLLADO CON PROTEÍNAS PARCIALMENTE PURIFICADAS DE LARVAS DE INSECTO

Como se ha comentado anteriormente, los sistemas comerciales de diagnóstico serológico para el VHE son escasos y todos ellos utilizan como antígenos ORF2 y/o ORF3 de genotipo I y II. Estos estuches tienen un coste elevado, lo que dificulta su uso rutinario en regiones endémicas, en muchos casos con una economía prácticamente inexistente, donde las inadecuadas condiciones higiénicas favorecen el desarrollo de epidemias. Además, estos sistemas están desarrollados para ser empleados exclusivamente en humanos y no se han validado como herramientas para el diagnóstico de muestras porcinas. De hecho, la falta de validación y estandarización de los distintos métodos empleados en los estudios epidemiológicos realizados han originado que las prevalencias descritas sean muy variables.

Por todo lo expuesto, se procedió a comparar el sistema de ELISA desarrollado con las proteínas parcialmente purificadas de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes con uno de los estuches comerciales empleado más frecuentemente en la actualidad. La concordancia entre ambos sistemas fue buena, del 92.5% con sueros humanos y del 80% con los porcinos. Si bien en este último caso hay que tener en cuenta que el sistema comercial tuvo que modificarse para su uso en muestras porcinas. De cualquier modo, concordancias similares (85%) se han descrito cuando se han comparado tres estuches comerciales con muestras de un brote epidémico (159). De la misma forma, la concordancia en ELISA hallada para muestras humanas entre el estuche comercial ensayado aquí y otros sistemas basados en proteínas recombinantes de origen humano de genotipo I y porcino de genotipo IV mostraron concordancias del 90.3% y 92% respectivamente (12).

Se ha descrito que, a pesar de la limitación que presenta en la posible detección de epítomos conformacionales, la detección de sueros por WB es más sensible que mediante ELISA (88), por lo que se ha propuesto su uso como ensayo de referencia o *gold-standard*. El análisis realizado mediante WB en esta tesis mostró una buena especificidad de ambos sistemas (96.4%) con sueros humanos y una mayor especificidad del ELISA desarrollado en este estudio con sueros porcinos (100% vs 88.2%). Estos datos concuerdan con los publicados recientemente (88, 138) mostrando especificidades del 92-93% en muestras humanas, menores a las proporcionadas por los fabricantes del estuche comercial.

De modo similar, la sensibilidad mostrada por el ensayo basado en la forma truncada con sueros porcinos (96.9%) y humanos (100%) fue muy buena e incluso mayor que la obtenida con el estuche comercial (75% y 83% para sueros humanos y porcinos respectivamente). Estos valores son similares (86-88%) a los descritos durante el desarrollo de esta tesis en pacientes infectados con genotipo III procedentes de áreas de bajo endemismo (88, 138). Los pocos sueros porcinos (n=3) y humanos (n=1) que resultaron positivos con el estuche comercial y negativos con los ELISA y WB desarrollados en este estudio podrían estar reaccionando con ORF3, presente sólo en el sistema comercial.

En resumen, los resultados obtenidos en la validación del sistema de ELISA puesto a punto demuestran su utilidad para la detección de infección con el VHE tanto en poblaciones humanas como porcinas.

4. DETECCIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DEL VHE EN LA CABAÑA PORCINA ESPAÑOLA

a) Detección serológica

Los datos de seroprevalencia de IgG anti-VHE en cerdos (20.4%) y granjas (81.2%) encontrados en este estudio indican que la infección está ampliamente distribuida en la cabaña porcina española, siendo significativamente mayor en animales adultos (30.2%) que en jóvenes (15.5%). Datos aparecidos muy recientemente (206) describen una prevalencia similar en granjas (98%) y en animales (42%) del Noroeste de España, la cual es mayor también en adultos (61% vs 38%). En cualquier caso, la seroprevalencia descrita en distintas regiones del mundo es muy variable, 15-80% (10, 45, 197, 217, 253).

Cuando se analizaron los datos en las distintas provincias muestreadas se observó que en todas ellas había animales con serología positiva y que la prevalencia era también muy variable, 2.5-26.4%, tanto en animales jóvenes (0-20%) como adultos (4.8-37%). Seroprevalencias dispares en zonas geográficas próximas entre sí también han sido descritas en Canadá, 38.3-88.8% (70), y China, 11-100%, (253).

En un grupo de granjas de 3 regiones geográficas distintas se recogieron muestras de sangre de 620 animales a distintos tiempos (3, 5, 7, 15 y 20 semanas de edad), si bien estas muestras se recogieron aleatoriamente, de modo que no en todos los casos correspondían al mismo animal, sino a animales de una misma explotación. Los datos de

prevalencia de IgG anti-VHE en estas muestras indicaron que en la tercera semana de vida el 6.9% de los cerdos eran positivos, disminuyendo en las siguientes semanas hasta alcanzar un 1.4% en la semana 11, para volver a aumentar hasta alcanzar valores (31%) a las 15 semanas similares a los observados en la población adulta en las diferentes regiones estudiadas (32%). Estos datos son comparables a los detectados en un estudio similar realizado en una única granja (111) y sugieren que los anticuerpos específicos detectados en los animales más jóvenes (3 semanas) corresponden a anticuerpos transferidos por las madres, los cuales van desapareciendo con el tiempo hasta que unas semanas después, una vez perdida la inmunidad materna, una proporción considerable de los animales se infecta con el virus circulante en la granja y desarrolla anticuerpos propios.

b) Detección molecular

Dado que no se dispone de un cultivo celular susceptible, la determinación de la presencia de una infección activa se realiza mediante la detección del ARN vírico en heces o sueros. Los datos obtenidos en este estudio indican que un número considerable de animales (18.8%) presenta una infección activa, siendo ésta significativamente más frecuente en animales jóvenes (25.7%) que en adultos (13.9%). De nuevo, los datos de presencia de ARN del VHE descritos en la población porcina de diferentes regiones alrededor del mundo son muy variables, 2-60% (10, 45, 49, 65, 93, 121, 178, 193, 194, 197, 206, 217, 238, 253). La disparidad de datos puede deberse, al menos parcialmente, a las diferencias entre los sistemas de detección empleados.

En el caso de España, los dos únicos trabajos publicados hasta la fecha, han descrito prevalencias de ARN de la población porcina ligeramente superiores (23-38%) a los observados en este estudio (49, 65). Los datos publicados sobre la presencia de ARN del VHE en animales de distintas edades son difíciles de comparar entre sí debido a las diferencias metodológicas aplicadas y a la distribución por edades de los mismos. Así, se han descrito prevalencias del 86.7% en animales de 12-20 semanas (206), pero también del 32%, 11% y 5% según los animales tuvieran entre 5-12, 13-20 o más de 25 semanas de edad (65). Un estudio similar llevado a cabo en Corea mostró prevalencias del 6.3% en lechones lactantes, del 16.3% en los lechones destetados, del 38% en los animales de cebo y del 9.3% en los adultos (121). Estos datos ponen de manifiesto la variabilidad de resultados obtenidos, incluso dentro de una misma región, pero confirman, tal y como se ha observado en este estudio, que el número de infecciones activas es mayor en animales jóvenes.

El análisis de la presencia de ARN del VHE en las granjas también confirmó su gran difusión por la geografía de España. El 47.2% de las granjas incluidas en el estudio presentaba, al menos, un animal con infección activa. Los datos de otras regiones muestran prevalencias de alrededor del 50%, similares a las halladas en nuestro estudio (93, 193). En el presente trabajo se observó que, si bien la presencia de animales con ARN del VHE era mayor en granjas de animales jóvenes que de adultos (60% vs 38.1%), estas diferencias no alcanzaban significación estadística, habiendo además una gran variación en el número de animales infectados en las diferentes granjas. En algunas de ellas no se detectó ningún animal infectado, mientras que en otras la totalidad de los animales testados lo estaban en el momento del muestreo.

El análisis filogenético realizado con las secuencias amplificadas demostró que, como en el resto de los países europeos (140) incluyendo España (65, 206), todas ellas pertenecían al genotipo III. De forma similar, los análisis de secuencias de aislados porcinos de otras regiones donde también circula el genotipo IV ponen de manifiesto que aunque existe una distribución de genotipos más heterogénea, ésta es predominantemente de genotipo III (121).

c) Prevalencia de ARN del VHE e IgG anti-VHE.

El análisis de IgG anti-VHE en el mismo subgrupo de cerdos en los que se determinó la presencia de ARN del VHE mostró que el 39.5% de los animales presentaba anticuerpos específicos, independientemente de la edad de los cerdos. Dado que los animales jóvenes de este subgrupo tenían entre 9 y 25 semanas de edad, los datos son coherentes con los obtenidos en el estudio de seroprevalencia de la población porcina en las distintas regiones analizadas, así como con el estudio de prevalencia en animales jóvenes de distintas edades, y confirman que, un vez perdidos los anticuerpos maternos, los cerdos son capaces de infectarse y desarrollar una respuesta inmune específica.

Los datos de la estimación de IgG anti-VHE y ARN del VHE en el mismo grupo de animales indican que aproximadamente la mitad de ellos no habían tenido contacto con el virus, puesto que no presentaban ninguno de los dos marcadores analizados. Por otra parte, el 12% presentaba signos de una infección reciente, dado que en ellos se detectó ARN, pero no anticuerpos específicos. De nuevo, y confirmando los datos anteriores, la proporción de animales positivos para el ARN era mayor entre animales jóvenes que entre adultos (17.1% vs 8.5%), indicando que la infección ocurre principalmente a edades

tempranas. Únicamente el 6.7% de los animales estudiados tenían ambos marcadores en sangre, siendo en este caso similares los valores encontrados en cerdos jóvenes y adultos. Finalmente, una tercera parte de los cerdos (32.8%), presentaron IgG específica, pero no ARN del VHE, independientemente de la edad del animal lo que, de nuevo, refleja el hecho de que la mayoría de los animales jóvenes estudiados en este grupo tenían más de 15 semanas de edad.

Así pues, todos los datos de prevalencia de anticuerpos anti-VHE y ARN del virus indican que el VHE circula habitualmente en las granjas de cerdos de cebo y lo continúa haciendo en las granjas de cerdas reproductoras. Para que una infección progrese en una población la proporción de animales infectados debe de situarse entre el 20-30% pero, por otra parte, en poblaciones estables, cuando el número de animales inmunizados es superior al 70-80%, la infección debería detenerse. En base a ello y a los datos obtenidos en este trabajo, lo esperable sería que esto último fuera lo que ocurriera en la cabaña porcina. Sin embargo, dado que los animales que no se dedican a la reproducción, suelen ser sacrificados a los 6 meses de edad, cuando la infección aún sigue propagándose, probablemente en esta población no se alcanzan los niveles de inmunidad necesarios para impedir que el virus continúe circulando en este tipo de explotaciones. Utilizando el mismo argumento, y asumiendo que la presencia de IgG específica es indicativa de la inmunización de la población, dados los porcentajes de anticuerpos detectados en los animales adultos, sería esperable que la infección se detuviera en las granjas de cerdas reproductoras. No obstante, en estas explotaciones el porcentaje de reposición anual de animales varía entre el 25-40%, por lo que, dado el porcentaje de animales jóvenes sin inmunizar observado, es esperable que el 20-30% de los animales que se introducen en las granjas para reponer la población esté sin inmunizar, lo que sumado a los animales no infectados / inmunizados remanentes en las explotaciones de cerdas reproductoras, permitiría que el virus siguiera circulando. Así pues, los datos obtenidos sugieren que la dinámica de la infección con el VHE presenta indicios de que, en la situación actual de las explotaciones, la hepatitis E se convertirá en endémica en el ganado porcino español.

5. ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL MODELO MURINO

El desarrollo de vacunas frente al VHE presenta el inconveniente de la falta de un modelo animal de experimentación adecuado. Hasta la fecha, los únicos animales válidos eran los primates, pero en éstos, el desarrollo de la enfermedad no mimetiza completamente lo que ocurre en humanos, especialmente en hembras preñadas en las que no se origina la mortandad observada en mujeres embarazadas ni se ve comprometida la viabilidad de fetos y crías (7, 234). Además, la utilización de primates entraña diversas dificultades de carácter ético, económico y logístico.

La reciente descripción de la infección en cerdos, la similitud entre las secuencias que infectan a éstos y a humanos, y a pesar de que la enfermedad en el ganado porcino cursa de modo asintomático, abre la posibilidad de usar estos animales como modelos para el ensayo de vacunas.

Con el fin de llevar a cabo una primera aproximación al posible uso de las proteínas recombinantes generadas como inmunógenos, se llevaron a cabo experimentos de inmunización en ratones, de modo que los resultados obtenidos, en el caso de ser satisfactorios, pudieran ser transferidos al modelo porcino. En cualquier caso, hay que reseñar que en los ratones no se pudo determinar la capacidad protectora de los candidatos vacunales ensayados dado que no son susceptibles a la infección, si bien muy recientemente, y con posterioridad al inicio de los experimentos aquí descritos, se ha publicado la infección experimental de cepas de ratones Balb/c sin timo (92). De confirmarse estos datos, se dispondría de un modelo de experimentación más económico y manejable.

5.1 Producción de anticuerpos específicos

Todos los ratones inmunizados, tanto con ORF2 completa como con la forma truncada, desarrollaron anticuerpos específicos frente al VHE, si bien, en el caso de la forma completa la respuesta inducida varió en función de la dosis administrada y del número de inmunizaciones recibidas, de modo que se requirieron dos inmunizaciones de, al menos, 10µg de proteína/ratón para alcanzar niveles detectables de anticuerpos. Por otra parte, los títulos de anticuerpos aumentaron considerablemente en todos los casos tras la tercera inmunización y permanecieron elevados hasta la conclusión del experimento, 4 meses tras la primera inmunización.

Además, los niveles de anticuerpos generados en los ratones siempre fueron mayores cuando se utilizó como inmunógeno la forma truncada de ORF2. Aunque hay datos que indican que la capacidad inmunogénica de distintas construcciones recombinantes depende de la presencia de un posible epítipo inmunodominante localizado en los aminoácidos 609-660 del C-terminal de la proteína (135, 188), éste no parece ser el caso en el estudio descrito aquí puesto que ambas proteínas recombinantes mantienen la región C-terminal invariable. Un factor que puede contribuir a explicar las diferencias encontradas es el hecho de que, en el sistema de expresión empleado y tal y como ponen de manifiesto los resultados comentados anteriormente, sólo la forma truncada se glicosila, lo que puede influir en el plegamiento de la misma y, consecuentemente, en la exposición de epítipos, así como en el hecho de que en muchas ocasiones las proteínas glicosiladas son más inmunogénicas (50).

Resultados similares con un 100% de ratones inmunizados se observaron con los inmunógenos expresados en el sistema del virus vaccinia. En este caso, mientras que la forma completa de ORF2 originó la producción de anticuerpos específicos tras dos inmunizaciones con la dosis más pequeña (10^5 ufp/ratón), con la forma truncada se requirieron tres inyecciones con la dosis más elevada (10^6 ufp/ratón) para lograr inmunizar al 100% de los ratones. De nuevo, los datos de glicosilación podrían estar influyendo en la diferente inmunogenicidad de ambas proteínas recombinantes dado que, como se ha comentado anteriormente, en el sistema del virus vaccinia es la forma completa y no la truncada la que se glicosila.

En conclusión los resultados observados ponen de manifiesto el valor de los inmunógenos ensayados como posibles candidatos vacunales, los cuales está previsto que se utilicen a lo largo de los próximos meses en el modelo porcino.

5.2 Estudios de las rutas de transmisión vertical de la inmunidad adquirida

Con el fin de estudiar la capacidad de las hembras inmunizadas para transferir anticuerpos específicos a su progenie y las rutas por las cuales podría ocurrir dicha transferencia, se preñaron ratonas previamente inmunizadas y se analizó la presencia de anticuerpos en sus crías. Para poder discernir entre transferencia transplacentaria o por lactancia, crías de madres inmunizadas y no inmunizadas fueron intercambiadas tras el parto, de modo que las madres inmunizadas amamantaron tanto a sus propios hijos como a hijos de madres sin inmunizar y lo mismo hicieron las madres no inmunizadas.

Todas las crías de madres inmunizadas presentaron anticuerpos específicos, independientemente del inmunógeno y del sistema de expresión utilizado, tanto si fueron amamantadas por sus propias madres, como si lo fueron por madres sin inmunizar. Mientras que, en el primer caso, no se puede discernir si la inmunización vertical ocurrió por vía intrauterina o por lactancia, en el segundo, la única posibilidad es que las crías adquirieran la inmunidad de modo transplacentario, dado que fueron criadas por madres no inmunizadas.

Por otra parte, se observó que la inmunidad adquirida tras la inmunización con antígenos expresados en el sistema de baculovirus era más duradera, dado que 18 días tras el parto en todas las crías se seguían detectando anticuerpos específicos, mientras que a 30 d.p.p. ya únicamente la mitad de los animales los presentaban. Por el contrario, en los animales cuyas madres habían sido inmunizadas con antígenos expresados por los virus vaccina recombinantes, el porcentaje de crías con anticuerpos disminuía rápidamente tras el parto, de modo que 18 días después únicamente se podían detectar en un cuarto de los animales y 30 d.p.p. no se detectaban en ninguno de ellos.

Los datos obtenidos también demostraron que había una transmisión eficiente de anticuerpos específicos a través de la leche. Se detectaron anticuerpos en el 100% de las crías de madres no inmunizadas que fueron amamantadas por madres que sí lo estaban. La inmunidad en estos animales se mantuvo hasta, al menos, 30 d.p.p., cuando los animales ya llevaban un mínimo de 7 días destetados. Estos resultados fueron similares tanto en los animales que habían mamado calostro como en aquellos que no lo habían hecho.

Estos datos indican que, en el modelo murino, la transmisión de anticuerpos específicos IgG generados por la inmunización con proteínas recombinantes, obtenidas tanto en el sistema del virus vaccinia como, especialmente, en el de baculovirus es eficiente tanto por vía transplacentaria como por lactancia.

6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los AcMo son herramientas de laboratorio muy útiles con un amplio espectro de aplicaciones, que pueden ir desde la puesta a punto de sistemas de detección mediante técnicas inmunológicas (ELISA, WB, inmunofluorescencia, etc.), purificación de proteínas por inmunoafinidad, estudio de la localización intracelular de proteínas víricas,

localización y caracterización de epítomos, estudio de los mecanismos de neutralización de la infectividad, etc.

Hasta la fecha hay pocos AcMo frente al VHE descritos en la literatura (51, 56, 86, 130, 141, 204, 257, 258) y ninguno de ellos está generado contra proteínas de genotipo III. Por ello y, una vez establecida la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes generadas, se obtuvieron anticuerpos monoclonales murinos que fueron parcialmente caracterizados. Estos anticuerpos son capaces de reconocer, tanto en ELISA como en WB, todas las proteínas recombinantes generadas. Además, se ha demostrado su utilidad en ensayos de inmunofluorescencia. Es más, los ensayos de competición realizados indican que los dos AcMo más caracterizados reconocen epítomos diferentes.

En estos momentos se está procediendo a una mejor caracterización de los epítomos reconocidos por ambos anticuerpos mediante la expresión de construcciones recombinantes solapantes que cubren la proteína ORF2 entera. Así mismo, los dos AcMo se han enviado al laboratorio del Dr. X.J. Meng (Regional College of Veterinary Medicine at Virginia Tech, E.E.U.U.), para determinar su utilidad como reactivos para el reconocimiento de antígenos víricos en tejidos de cerdos infectados, y al del Dr. W. van der Poel (Central Veterinary Institute at Lelystad, Holanda), para la determinación de su capacidad neutralizante en un sistema de cultivo celular recientemente desarrollado por ellos y aún no publicado.

CONCLUSIONES

1. Las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r del VHE se expresan eficientemente en células de insecto Sf21 infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, respectivamente. ORF2r aparece como una proteína mayoritaria de unos 78 kDa junto con algunas especies reactivas de menor masa de alrededor de 65 y 68 kDa y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r como un doblete mayoritario de entre 65 y 68 kDa junto a otras especies minoritarias, que en conjunto varían entre los 62-70 kDa, de las cuales, al menos tres formas están N-glicosiladas.
2. Las proteínas ORF2r y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r expresadas en larvas de insecto de *Trichoplusia ni* infectadas con los baculovirus recombinantes BAC-ORF2 y BAC- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, respectivamente, dan lugar en ambos casos a un doblete de 62-65 kDa con un rendimiento notablemente mayor de la forma truncada.
3. La proteína ORF2r-vv y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv del VHE se expresan eficientemente en células de mamífero BSC-1 y BHK-21 infectadas con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 y VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2, respectivamente. ORF2r-vv aparece como un conjunto de bandas de entre 80-90 kDa, con al menos tres formas N-glicosiladas y $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv aparece como un doblete de entre 60-62 kDa.
4. La proteína ORF2-vv en células BSC-1 y BHK-21 infectadas con el virus vaccinia recombinante VV-ORF2 se localiza en RE, en el complejo de Golgi y en la superficie celular, mientras que en estas células infectadas con el virus vaccinia recombinante VV- $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2 la proteína $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r-vv aparece localizada en el RE
5. Todas las proteínas recombinantes generadas son eficaces en la detección de anticuerpos específicos frente al VHE en sueros porcinos y, en el caso de las proteínas generadas en baculovirus, también en sueros humanos, obteniéndose los mejores resultados con la proteína truncada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r parcialmente purificada de extractos de larvas infectadas. Los ELISA desarrollados presentaron una muy buena especificidad y sensibilidad cuando se compararon con un estuche comercial de uso habitual.
6. El VHE está ampliamente extendido en la cabaña porcina española. La mitad de las granjas analizadas presentaron, al menos, un animal con ARN vírico en sangre, lo que

representa un cuarto de los animales analizados, siendo mayor la prevalencia en animales jóvenes. Del mismo modo, en una quinta parte de las muestras analizadas se detectó IgG anti-VHE, siendo en este caso mayor la prevalencia en animales adultos. Esta serología positiva está presente en más de tres cuartos de las granjas analizadas.

7. El genotipo predominante del VHE en la cabaña porcina española es el genotipo III
8. Todas las proteínas recombinantes generadas son eficaces como inmunógenos, originando títulos elevados de anticuerpos específicos cuando se inoculan en ratones
9. Los hijos nacidos de madres inmunizadas adquieren inmunidad pasiva tanto por vía intrauterina como por lactancia.
10. Los anticuerpos monoclonales 4G11 y 2F8 generados contra la proteína parcialmente purificada $\Delta_{(1-111)}$ -ORF2r son una buena herramienta de investigación y diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. 1994. Induction of Immune Responses. *In* J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, M. D.H., E. M. Shevach, and W. Strober (ed.), *Current Protocols in Immunology*, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc.
2. **Abe, K., T. C. Li, X. Ding, K. M. Win, P. K. Shrestha, V. X. Quang, T. T. Ngoc, T. C. Taltavull, A. V. Smirnov, V. F. Uchaikin, P. Luengrojanakul, H. Gu, A. R. El-Zayadi, A. M. Prince, K. Kikuchi, N. Masaki, A. Inui, T. Sata, and N. Takeda.** 2006. International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **37**:90-5.
3. **Aggarwal, R., D. Kini, S. Sofat, S. R. Naik, and K. Krawczynski.** 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* **356**:1081-2.
4. **Aggarwal, R., and K. Krawczynski.** 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* **15**:9-20.
5. **Aggarwal, R., and S. R. Naik.** 1994. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J Hepatol* **21**:718-23.
6. **Aggarwal, R., H. Shahi, S. Naik, S. K. Yachha, and S. R. Naik.** 1997. Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India. *J Hepatol* **26**:1425-6.
7. **Arankalle, V. A., M. S. Chadha, K. Banerjee, M. A. Srinivasan, and L. P. Chobe.** 1993. Hepatitis E virus infection in pregnant rhesus monkeys. *Indian J Med Res* **97**:4-8.
8. **Arankalle, V. A., M. S. Chadha, and L. P. Chobe.** 1999. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J Hepatol* **30**:199-204.
9. **Arankalle, V. A., M. S. Chadha, L. P. Chobe, R. Nair, and K. Banerjee.** 1995. Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different Indian isolates of hepatitis E virus. *J Med Virol* **46**:358-63.
10. **Arankalle, V. A., L. P. Chobe, M. V. Joshi, M. S. Chadha, B. Kundu, and A. M. Walimbe.** 2002. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J Hepatol* **36**:417-25.
11. **Arankalle, V. A., M. V. Joshi, A. M. Kulkarni, S. S. Gandhe, L. P. Chobe, S. S. Rautmare, A. C. Mishra, and V. S. Padbidri.** 2001. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* **8**:223-7.
12. **Arankalle, V. A., K. S. Lole, T. M. Deshmukh, L. P. Chobe, and S. S. Gandhe.** 2007. Evaluation of human (genotype 1) and swine (genotype 4)-ORF2-based ELISAs for anti-HEV IgM and IgG detection in an endemic country and search for type 4 human HEV infections. *J Viral Hepat* **14**:435-45.
13. **Arankalle, V. A., S. Paranjape, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and A. M. Walimbe.** 1999. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J Gen Virol* **80** (Pt 7):1691-700.
14. **Ayoola, E. A., M. A. Want, M. O. Gadour, M. H. Al-Hazmi, and M. K. Hamza.** 2002. Hepatitis E virus infection in haemodialysis patients: a case-control study in Saudi Arabia. *J Med Virol* **66**:329-34.
15. **Balayan, M. S., A. G. Andjaparidze, S. S. Savinskaya, E. S. Ketiladze, D. M. Braginsky, A. P. Savinov, and V. F. Poleschuk.** 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**:23-31.
16. **Balayan, M. S., R. K. Usmanov, N. A. Zamyatina, D. I. Djumalieva, and F. R. Karas.** 1990. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* **32**:58-9.
17. **Banks, M., R. Bendall, S. Grierson, G. Heath, J. Mitchell, and H. Dalton.** 2004. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* **10**:953-5.
18. **Barderas, M. G., A. Wigdorovitz, F. Merelo, F. Beitia, C. Alonso, M. V. Borca, and J. M. Escribano.** 2000. Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. *J Virol Methods* **89**:129-36.

19. **Berke, T., and D. O. Matson.** 2000. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* **145**:1421-36.
20. **Bienkowska-Szewczyk, K., and B. Szewczyk.** 1999. Expression of genes coding for animal virus glycoproteins in heterologous systems. *Acta Biochim Pol* **46**:325-39.
21. **Bile, K., A. Isse, O. Mohamud, P. Allebeck, L. Nilsson, H. Norder, I. K. Mushahwar, and L. O. Magnus.** 1994. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am J Trop Med Hyg* **51**:466-74.
22. **Blasco, R., and B. Moss.** 1991. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol* **65**:5910-20.
23. **Blasco, R., and B. Moss.** 1995. Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* **158**:157-62.
24. **Bouwknegt, M., K. Frankena, S. A. Rutjes, G. J. Wellenberg, A. M. de Roda Husman, W. H. van der Poel, and M. C. de Jong.** 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res* **39**:40.
25. **Bouwknegt, M., F. Lodder-Verschoor, W. H. van der Poel, S. A. Rutjes, and A. M. de Roda Husman.** 2007. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* **70**:2889-95.
26. **Boxall, E., A. Herborn, G. Kochethu, G. Pratt, D. Adams, S. Ijaz, and C. G. Teo.** 2006. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* **16**:79-83.
27. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
28. **Bryan, J. P., S. A. Tsarev, M. Iqbal, J. Ticehurst, S. Emerson, A. Ahmed, J. Duncan, A. R. Rafiqi, I. A. Malik, R. H. Purcell, and et al.** 1994. Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis* **170**:517-21.
29. **Buti, M., P. Clemente-Casares, R. Jardi, M. Formiga-Cruz, M. Schaper, A. Valdes, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban, and R. Girones.** 2004. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* **41**:126-31.
30. **Buti, M., A. Dominguez, P. Plans, R. Jardi, M. Schaper, J. Espunes, N. Cardenosa, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban, A. Plasencia, and L. Salleras.** 2006. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* **13**:1328-32.
31. **Buti, M., R. Jardi, M. Cotrina, F. Rodriguez-Frias, H. Troonen, L. Viladomiu, J. I. Esteban, R. Esteban, and J. Guardia.** 1995. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Methods* **55**:49-54.
32. **Cacopardo, B., R. Russo, W. Preiser, F. Benanti, G. Brancati, and A. Nunnari.** 1997. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* **25**:313-6.
33. **Carl, M., S. N. Isaacs, M. Kaur, J. He, A. W. Tam, P. O. Yarbough, and G. R. Reyes.** 1994. Expression of hepatitis E virus putative structural proteins in recombinant vaccinia viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* **1**:253-6.
34. **Caron, M., V. Enouf, S. C. Than, L. Dellamonica, Y. Buisson, and E. Nicand.** 2006. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* **44**:3440-2.
35. **Clayson, E. T., B. L. Innis, K. S. Myint, S. Narupiti, D. W. Vaughn, S. Giri, P. Ranabhat, and M. P. Shrestha.** 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* **53**:228-32.

36. **Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. Martín, S. Bofill-Mas, and R. Girones.** 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* **9**:448-54.
37. **Colson, P., C. Coze, P. Gallian, M. Henry, P. De Micco, and C. Tamalet.** 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* **13**:648-9.
38. **Corwin, A., K. Jarot, I. Lubis, K. Nasution, S. Suparmawo, A. Sumardiati, S. Widodo, S. Nazir, G. Orndorff, Y. Choi, and et al.** 1995. Two years' investigation of epidemic hepatitis E virus transmission in West Kalimantan (Borneo), Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**:262-5.
39. **Craighead, J. E.** 2000. *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease*. Academic Press, San Diego.
40. **Chandra, V., S. Taneja, M. Kalia, and S. Jameel.** 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* **33**:451-64.
41. **Chauhan, A., S. Jameel, J. B. Dilawari, Y. K. Chawla, U. Kaur, and N. K. Ganguly.** 1993. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* **341**:149-50.
42. **Chen, H. Y., Y. Lu, T. Howard, D. Anderson, P. Y. Fong, W. P. Hu, C. P. Chia, and M. Guan.** 2005. Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:593-8.
43. **Chobe, L. P., M. S. Chadha, K. Banerjee, and V. A. Arankalle.** 1997. Detection of HEV RNA in faeces, by RT-PCR during the epidemics of hepatitis E in India (1976-1995). *J Viral Hepat* **4**:129-33.
44. **Choi, C., and C. Chae.** 2003. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* **38**:827-32.
45. **Choi, I. S., H. J. Kwon, N. R. Shin, and H. S. Yoo.** 2003. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol* **41**:3602-8.
46. **Dalekos, G. N., E. Zervou, M. Elisaf, N. Germanos, E. Galanakis, K. Bourantas, K. C. Siamopoulos, and E. V. Tsianos.** 1998. Antibodies to hepatitis E virus among several populations in Greece: increased prevalence in an hemodialysis unit. *Transfusion* **38**:589-95.
47. **Dalton, H. R., W. Stableforth, P. Thuraiajah, S. Hazeldine, R. Remnarace, W. Usama, L. Farrington, N. Hamad, C. Sieberhagen, V. Ellis, J. Mitchell, S. H. Hussaini, M. Banks, S. Ijaz, and R. P. Bendall.** 2008. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**:784-90.
48. **de Deus, N., B. Peralta, S. Pina, A. Allepuz, E. Mateu, D. Vidal, F. Ruiz-Fons, M. Martín, C. Gortazar, and J. Segales.** 2008. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* **129**:163-70.
49. **de Deus, N., C. Seminati, S. Pina, E. Mateu, M. Martín, and J. Segalés.** 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* **119**:2-4.
50. **de la Fuente, J., M. Canales, and K. M. Kocan.** 2006. The importance of protein glycosylation in development of novel tick vaccine strategies. *Parasite Immunol* **28**:687-8.
51. **Deng, L., J. H. Meng, Y. Zhao, H. M. Zhang, and X. Dai.** 2006. [Hepatitis E virus of different genotypes contains multiple-type antigenic epitopes]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **46**:120-6.
52. **Drobeniuc, J., M. O. Favorov, C. N. Shapiro, B. P. Bell, E. E. Mast, A. Dadu, D. Culver, P. Iarovoi, B. H. Robertson, and H. S. Margolis.** 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* **184**:1594-7.
53. **Elbein, A. D.** 1987. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem* **56**:497-534.

54. **Elbein, A. D.** 1984. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit Rev Biochem* **16**:21-49.
55. **Emerson, S. U., D. Anderson, A. Arankalle, X. J. Meng, M. Purdy, G. G. Schlauder, and S. A. Tsarev.** 2004. Hepatitis E virus, p. 851-855. *In* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, M. J., D. U., and L. A. Ball (ed.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/ Academic Press, London.
56. **Emerson, S. U., P. Clemente-Casares, N. Moiduddin, V. A. Arankalle, U. Torian, and R. H. Purcell.** 2006. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol* **87**:697-704.
57. **Emerson, S. U., and R. H. Purcell.** 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* **13**:145-54.
58. **Engelstad, M., S. T. Howard, and G. L. Smith.** 1992. A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope. *Virology* **188**:801-10.
59. **Engle, R. E., C. Yu, S. U. Emerson, X. J. Meng, and R. H. Purcell.** 2002. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* **40**:4576-80.
60. **Erker, J. C., S. M. Desai, and I. K. Mushahwar.** 1999. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J Virol Methods* **81**:109-13.
61. **Erker, J. C., S. M. Desai, G. G. Schlauder, G. J. Dawson, and I. K. Mushahwar.** 1999. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* **80** (Pt 3):681-90.
62. **Estes, M. K., and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**:410-49.
63. **Favorov, M. O., H. A. Fields, M. A. Purdy, T. L. Yashina, A. G. Aleksandrov, M. J. Alter, D. M. Yarasheva, D. W. Bradley, and H. S. Margolis.** 1992. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* **36**:246-50.
64. **Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng.** 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* **88**:912-7.
65. **Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, M. T. Gomez-Munoz, S. Vega, M. A. Rodriguez-Iglesias, and M. T. Perez-Gracia.** 2007. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res* **71**:236-40.
66. **Fix, A. D., M. Abdel-Hamid, R. H. Purcell, M. H. Shehata, F. Abdel-Aziz, N. Mikhail, H. el Sebai, M. Nafeh, M. Habib, R. R. Arthur, S. U. Emerson, and G. T. Strickland.** 2000. Prevalence of antibodies to hepatitis E in two rural Egyptian communities. *Am J Trop Med Hyg* **62**:519-23.
67. **Fry, K. E., A. W. Tam, M. M. Smith, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, M. Piatak, R. A. Feldman, K. Y. Yun, M. A. Purdy, and et al.** 1992. Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes* **6**:173-85.
68. **Galiana, C., S. Fernandez-Barredo, A. Garcia, M. T. Gomez, and M. T. Perez-Gracia.** 2008. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* **78**:1012-5.
69. **Garkavenko, O., A. Obriadina, J. Meng, D. A. Anderson, H. J. Benard, B. A. Schroeder, Y. E. Khudyakov, H. A. Fields, and M. C. Croxson.** 2001. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* **65**:525-9.
70. **Geng, Y., C. Wang, C. Zhao, X. Yu, T. J. Harrison, K. Tian, and Y. Wang.** 2009. Serological Prevalence of Hepatitis E Virus in Domestic Animals and Diversity of Genotype 4 Hepatitis E Virus in China. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
71. **Ghabrah, T. M., S. Tsarev, P. O. Yarbough, S. U. Emerson, G. T. Strickland, and R. H. Purcell.** 1998. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* **55**:134-7.

72. **Gomez-Sebastian, S., D. M. Perez-Filgueira, E. Gomez-Casado, M. C. Nunez, I. Sanchez-Ramos, E. Tabares, and J. M. Escribano.** 2008. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods* **153**:29-35.
73. **Graff, J., Y. H. Zhou, U. Torian, H. Nguyen, M. St Claire, C. Yu, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 2008. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol* **82**:1185-94.
74. **Grandadam, M., S. Tebbal, M. Caron, M. Siriwardana, B. Larouze, J. L. Koeck, Y. Buisson, V. Enouf, and E. Nicand.** 2004. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol* **85**:3189-94.
75. **Grimm, A. C., and G. S. Fout.** 2002. Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water. *J Virol Methods* **101**:175-88.
76. **Guthmann, J. P., H. Klovstad, D. Boccia, N. Hamid, L. Pinoges, J. Y. Nizou, M. Tatay, F. Diaz, A. Moren, R. F. Grais, I. Ciglenecki, E. Nicand, and P. J. Guerin.** 2006. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis* **42**:1685-91.
77. **Gyarmati, P., N. Mohammed, H. Norder, J. Blomberg, S. Belak, and F. Widen.** 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* **146**:226-35.
78. **Haagsma, E. B., H. G. Niesters, A. P. van den Berg, A. Riezebos-Brilman, R. J. Porte, H. Vennema, J. H. Reimerink, and M. P. Koopmans.** 2009. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* **15**:1225-8.
79. **Halbur, P. G., C. Kasorndorkbua, C. Gilbert, D. Guenette, M. B. Potters, R. H. Purcell, S. U. Emerson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* **39**:918-23.
80. **Haqshenas, G., F. F. Huang, M. Fenaux, D. K. Guenette, F. W. Pierson, C. T. Larsen, H. L. Shivaprasad, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 2002. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol* **83**:2201-9.
81. **Haqshenas, G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read, and X. J. Meng.** 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* **82**:2449-62.
82. **He, J., L. N. Binn, J. D. Caudill, L. V. Asher, C. F. Longer, and B. L. Innis.** 1999. Antiserum generated by DNA vaccine binds to hepatitis E virus (HEV) as determined by PCR and immune electron microscopy (IEM): application for HEV detection by affinity-capture RT-PCR. *Virus Res* **62**:59-65.
83. **He, J., W. M. Ching, P. Yarbough, H. Wang, and M. Carl.** 1995. Purification of a baculovirus-expressed hepatitis E virus structural protein and utility in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **33**:3308-11.
84. **He, J., C. G. Hayes, L. N. Binn, J. Seriwatana, D. W. Vaughn, R. A. Kuschner, and B. L. Innis.** 2001. Hepatitis E virus DNA vaccine elicits immunologic memory in mice. *J Biomed Sci* **8**:223-6.
85. **He, J., B. L. Innis, M. P. Shrestha, E. T. Clayson, R. M. Scott, K. J. Linthicum, G. G. Musser, S. C. Gigliotti, L. N. Binn, R. A. Kuschner, and D. W. Vaughn.** 2002. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J Clin Microbiol* **40**:4493-8.
86. **He, J., R. A. Kuschner, V. Dewar, P. Voet, L. V. Asher, and D. W. Vaughn.** 2007. Characterization of monoclonal antibodies to hepatitis E virus (HEV) capsid protein and identification of binding activity. *J Biomed Sci* **14**:555-63.
87. **He, J., A. W. Tam, P. O. Yarbough, G. R. Reyes, and M. Carl.** 1993. Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* **31**:2167-73.

88. **Herremans, M., J. Bakker, E. Duizer, H. Vennema, and M. P. Koopmans.** 2007. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin Vaccine Immunol* **14**:562-8.
89. **Herremans, M., E. Duizer, E. Jusic, and M. P. Koopmans.** 2007. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol* **14**:276-80.
90. **Hirano, M., X. Ding, H. T. Tran, T. C. Li, N. Takeda, T. Sata, S. Nakamura, and K. Abe.** 2003. Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn J Infect Dis* **56**:8-11.
91. **Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. T. Liu, A. W. Tam, D. Y. Lin, and Y. F. Liaw.** 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* **37**:3828-34.
92. **Huang, F., W. Zhang, G. Gong, C. Yuan, Y. Yan, S. Yang, L. Cui, J. Zhu, Z. Yang, and X. Hua.** 2009. Experimental infection of Balb/c nude mice with Hepatitis E virus. *BMC Infect Dis* **9**:93.
93. **Huang, F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* **40**:1326-32.
94. **Huang, F. F., Z. F. Sun, S. U. Emerson, R. H. Purcell, H. L. Shivaprasad, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* **85**:1609-18.
95. **Humphrey, C. D., E. H. Cook, Jr., and D. W. Bradley.** 1990. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electron microscopy. *J Virol Methods* **29**:177-88.
96. **Hyams, K. C.** 2002. New perspectives on hepatitis E. *Curr Gastroenterol Rep* **4**:302-7.
97. **Hyams, K. C., M. C. McCarthy, M. Kaur, M. A. Purdy, D. W. Bradley, M. M. Mansour, S. Gray, D. M. Watts, and M. Carl.** 1992. Acute sporadic hepatitis E in children living in Cairo, Egypt. *J Med Virol* **37**:274-7.
98. **Hyams, K. C., M. A. Purdy, M. Kaur, M. C. McCarthy, M. A. Hussain, A. el-Tigani, K. Krawczynski, D. W. Bradley, and M. Carl.** 1992. Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: analysis based on a new western blot assay. *J Infect Dis* **165**:1001-5.
99. **Im, S. W., J. Z. Zhang, H. Zhuang, X. Y. Che, W. F. Zhu, G. M. Xu, K. Li, N. S. Xia, and M. H. Ng.** 2001. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* **19**:3726-32.
100. **Irshad, M.** 1999. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology* **42**:252-62.
101. **Isaacs, S. N., E. J. Wolffe, L. G. Payne, and B. Moss.** 1992. Characterization of a vaccinia virus-encoded 42-kilodalton class I membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope. *J Virol* **66**:7217-24.
102. **Ishikawa, K., K. Matsui, T. Madarame, S. Sato, K. Oikawa, and T. Uchida.** 1995. Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol* **30**:534-8.
103. **Jameel, S., H. Durgapal, C. M. Habibullah, M. S. Khuroo, and S. K. Panda.** 1992. Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* **37**:263-70.
104. **Jameel, S., M. Zafrullah, M. H. Ozdener, and S. K. Panda.** 1996. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *J Virol* **70**:207-16.

105. **Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng, and V. R. Hill.** 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* **131**:65-71.
106. **Kabrane-Lazizi, Y., J. B. Fine, J. Elm, G. E. Glass, H. Higa, A. Diwan, C. J. Gibbs, Jr., X. J. Meng, S. U. Emerson, and R. H. Purcell.** 1999. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **61**:331-5.
107. **Kabrane-Lazizi, Y., X. J. Meng, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 1999. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol* **73**:8848-50.
108. **Kamar, N., J. Selves, J. M. Mansuy, L. Ouezani, J. M. Peron, J. Guitard, O. Cointault, L. Esposito, F. Abravanel, M. Danjoux, D. Durand, J. P. Vinel, J. Izopet, and L. Rostaing.** 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* **358**:811-7.
109. **Kamili, S., J. Spelbring, D. Carson, and K. Krawczynski.** 2004. Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis* **189**:258-64.
110. **Kamili, S., J. Spelbring, and K. Krawczynski.** 2002. DNA vaccination against hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl 3**:S365-9.
111. **Kanai, Y., M. Tsujikawa, M. Yunoki, S. Nishiyama, K. Ikuta, and K. Hagiwara.** Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J Med Virol* **82**:69-76.
112. **Kasorndorkbua, C., T. Opriessnig, F. F. Huang, D. K. Guenette, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur.** 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* **71**:7831-7.
113. **Khudyakov, Y. E., N. S. Khudyakova, H. A. Fields, D. Jue, C. Starling, M. O. Favorov, K. Krawczynski, L. Polish, E. Mast, and H. Margolis.** 1993. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology* **194**:89-96.
114. **Khudyakov, Y. E., E. N. Lopareva, D. L. Jue, T. K. Crews, S. P. Thyagarajan, and H. A. Fields.** 1999. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* **37**:2863-71.
115. **Khuroo, M. S.** 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* **68**:818-24.
116. **Khuroo, M. S., and M. Y. Dar.** 1992. Hepatitis E: evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. *Indian J Gastroenterol* **11**:113-6.
117. **Khuroo, M. S., and S. Kamili.** 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* **10**:61-9.
118. **Khuroo, M. S., S. Kamili, M. Y. Dar, R. Moecklii, and S. Jameel.** 1993. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet* **341**:1355.
119. **Khuroo, M. S., S. Kamili, and S. Jameel.** 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* **345**:1025-6.
120. **Khuroo, M. S., S. Kamili, and G. N. Yatoo.** 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* **19**:778-84.
121. **Kim, S. E., M. Y. Kim, D. G. Kim, Y. J. Song, H. J. Jeong, S. W. Lee, J. B. Lee, S. Y. Park, C. S. Song, S. J. Oh, H. S. Yoo, and I. S. Choi.** 2008. Determination of fecal shedding rates and genotypes of swine hepatitis E virus (HEV) in Korea. *J Vet Med Sci* **70**:1367-71.
122. **Köhler, G., and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
123. **Koonin, E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes, and D. W. Bradley.** 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural

- polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8259-63.
124. **Krawczynski, K.** 1993. Hepatitis E. *Hepatology* **17**:932-41.
125. **Krawczynski, K.** 2007. Hepatitis E vaccine--ready for prime time? *N Engl J Med* **356**:949-51.
126. **Krawczynski, K., R. Aggarwal, and S. Kamili.** 2000. Hepatitis E. *Infect Dis Clin North Am* **14**:669-87.
127. **Krawczynski, K., S. Kamili, and R. Aggarwal.** 2001. Global epidemiology and medical aspects of hepatitis E. *Forum (Genova)* **11**:166-79.
128. **Kumar, A., R. Aggarwal, S. R. Naik, V. Saraswat, U. C. Ghoshal, and S. Naik.** 2004. Hepatitis E virus is responsible for decompensation of chronic liver disease in an endemic region. *Indian J Gastroenterol* **23**:59-62.
129. **Lee, C. C., Y. L. Shih, C. S. Laio, S. M. Lin, M. M. Huang, C. J. Chen, C. P. Chen, C. L. Chang, L. R. Chen, S. Y. Tschen, and C. H. Wang.** 2005. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among haemodialysis patients in Taiwan: possible infection by blood transfusion. *Nephron Clin Pract* **99**:c122-7.
130. **Li, L. F., W. X. Luo, Y. Gu, Z. H. Zhu, Y. B. Wang, J. Zhang, and N. S. Xia.** 2004. [Construction and expression of single-chain antibody of neutralizing monoclonal antibody 13D8 against hepatitis E virus]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **20**:556-9.
131. **Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura.** 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* **11**:1958-60.
132. **Li, T. C., T. Miyamura, and N. Takeda.** 2007. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* **76**:170-2.
133. **Li, T. C., Y. Suzuki, Y. Ami, H. Tsunemitsu, T. Miyamura, and N. Takeda.** 2008. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J Vet Med Sci* **70**:1359-62.
134. **Li, T. C., N. Takeda, and T. Miyamura.** 2004. [Hepatitis E vaccine]. *Nippon Rinsho* **62 Suppl 8**:548-53.
135. **Li, T. C., N. Takeda, T. Miyamura, Y. Matsuura, J. C. Wang, H. Engvall, L. Hammar, L. Xing, and R. H. Cheng.** 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* **79**:12999-3006.
136. **Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura.** 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* **71**:7207-13.
137. **Li, Z. N., and D. A. Steinhauer.** 2007. Expression and purification of viral glycoproteins using recombinant vaccinia viruses for functional and structural studies. *Methods Mol Biol* **379**:85-95.
138. **Lin, C. C., J. C. Wu, T. T. Chang, W. Y. Chang, M. L. Yu, A. W. Tam, S. C. Wang, Y. H. Huang, F. Y. Chang, and S. D. Lee.** 2000. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol* **38**:3915-8.
139. **Liu, H. H., X. Cao, Y. Yang, M. G. Liu, and Y. F. Wang.** 2006. Array-based nano-amplification technique was applied in detection of hepatitis E virus. *J Biochem Mol Biol* **39**:247-52.
140. **Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn.** 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**:5-36.
141. **Luo, W., Y. Chen, L. Li, C. Xu, J. Miao, J. W. Shih, J. Zhang, and N. Xia.** 2007. Construction and characterization of the chimeric antibody 8C11 to the hepatitis E virus. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**:18-25.
142. **Magden, J., N. Takeda, T. Li, P. Auvinen, T. Ahola, T. Miyamura, A. Merits, and L. Kaariainen.** 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J Virol* **75**:6249-55.

143. **Maneerat, Y., E. T. Clayson, K. S. Myint, G. D. Young, and B. L. Innis.** 1996. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* **48**:121-8.
144. **Mast, E. E., M. J. Alter, P. V. Holland, and R. H. Purcell.** 1998. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* **27**:857-61.
145. **Mateos, M. L., C. Camarero, E. Lasa, J. L. Teruel, N. Mir, and F. Baquero.** 1998. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and other risk groups. *Vox Sang* **75**:267-9.
146. **Mateos, M. L., A. Molina, H. T. Thuy, M. Víctor, M. José María, and B. Rafaél.** 2006. Hepatitis aguda E en Madrid: descripción de 18 casos. *Gastroenterol Hepatol* **29 (7)**:397-400.
147. **Matsubayashi, K., Y. Nagaoka, H. Sakata, S. Sato, K. Fukai, T. Kato, K. Takahashi, S. Mishihiro, M. Imai, N. Takeda, and H. Ikeda.** 2004. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* **44**:934-40.
148. **McAtee, C. P., Y. Zhang, P. O. Yarbough, T. Bird, and T. R. Fuerst.** 1996. Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2-derived protein with unique antigenic properties. *Protein Expr Purif* **8**:262-70.
149. **Meng, J., P. Dubreuil, and J. Pillot.** 1997. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol* **35**:1373-7.
150. **Meng, X. J., S. Dea, R. E. Engle, R. Friendship, Y. S. Lyoo, T. Sirinarumitr, K. Urairong, D. Wang, D. Wong, D. Yoo, Y. Zhang, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* **59**:297-302.
151. **Meng, X. J., P. G. Halbur, J. S. Haynes, T. S. Tsareva, J. D. Bruna, R. L. Royer, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* **143**:1405-15.
152. **Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**:9714-21.
153. **Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson.** 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9860-5.
154. **Meng, X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson, and R. H. Purcell.** 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* **40**:117-22.
155. **Mitsui, T., Y. Tsukamoto, C. Yamazaki, K. Masuko, F. Tsuda, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** 2004. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* **74**:563-72.
156. **Monga, R., S. Garg, P. Tyagi, and N. Kumar.** 2004. Superimposed acute hepatitis E infection in patients with chronic liver disease. *Indian J Gastroenterol* **23**:50-2.
157. **Mushahwar, I. K.** 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* **80**:646-58.
158. **Mushahwar, I. K., G. J. Dawson, K. M. Bile, and L. O. Magnius.** 1993. Serological studies of an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Somalia. *J Med Virol* **40**:218-21.
159. **Myint, K. S., T. P. Endy, R. V. Gibbons, K. Laras, M. P. Mammen, Jr., E. R. Sedyaningsih, J. Seriwatana, J. S. Glass, S. Narupiti, and A. L. Corwin.** 2006. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J Clin Microbiol* **44**:1581-3.
160. **Naik, S. R., R. Aggarwal, P. N. Salunke, and N. N. Mehrotra.** 1992. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* **70**:597-604.

161. **Nakamura, M., K. Takahashi, K. Taira, M. Taira, A. Ohno, H. Sakugawa, M. Arai, and S. Mishiro.** 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* **34**:137-40.
162. **Nanda, S. K., S. K. Panda, H. Durgapal, and S. Jameel.** 1994. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J Med Virol* **42**:237-40.
163. **Ng, D. T., J. D. Brown, and P. Walter.** 1996. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**:269-78.
164. **Okamoto, H.** 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127**:216-28.
165. **Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, K. Fukai, U. Muramatsu, and A. Yoshikawa.** 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:929-36.
166. **Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, R. Usui, and E. Kobayashi.** 2004. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* **32**:57-8.
167. **Olsen, B., D. Axelsson-Olsson, A. Thelin, and O. Weiland.** 2006. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* **38**:55-8.
168. **Orru, G., G. Masia, L. Romano, V. Piras, and R. C. Coppola.** 2004. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods* **118**:77-82.
169. **Parkkinen, J. J., M. J. Lammi, U. Agren, M. Tammi, T. A. Keinanen, T. Hyvonen, and T. O. Eloranta.** 1997. Polyamine-dependent alterations in the structure of microfilaments, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, and proteoglycan synthesis in BHK cells. *J Cell Biochem* **66**:165-74.
170. **Pastoret, P. P., and A. Vanderplasschen.** 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**:343-55.
171. **Paul, D. A., M. F. Knigge, A. Ritter, R. Gutierrez, T. Pilot-Matias, K. H. Chau, and G. J. Dawson.** 1994. Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis* **169**:801-6.
172. **Peralta, B.** 2008. Infección por el virus de la hepatitis E en animales domésticos. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
173. **Peralta, B., M. Biarnes, G. Ordonez, R. Porta, M. Martin, E. Mateu, S. Pina, and X. J. Meng.** 2009. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol* **137**:31-6.
174. **Peralta, B., M. Martín, and E. Mateu.** 2006. Detección de IgG e IgM contra el virus de la hepatitis E en la población canina de Barcelona. *Laboratorio Veterinario Avedila* **36**:2-6.
175. **Peralta, B., E. Mateu, M. Casas, N. de Deus, M. Martin, and S. Pina.** 2009. Genetic characterization of the complete coding regions of genotype 3 hepatitis E virus isolated from Spanish swine herds. *Virus Res* **139**:111-6.
176. **Perez-Filgueira, D. M., F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso, and J. M. Escribano.** 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol* **44**:3114-21.
177. **Perez-Gracia, M. T., M. S. Garcia-Valdivia, F. Galan, and M. A. Rodriguez-Iglesias.** 2004. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* **48**:197-200.
178. **Pina, S., M. Buti, M. Cotrina, J. Piella, and R. Girones.** 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* **33**:826-33.
179. **Pina, S., J. Jofre, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and R. Girones.** 1998. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* **64**:4485-8.

180. **Pintó, R., and J. C. Sáiz.** 2007. Human viruses in water, p. 39-67. *In* A. Bosch (ed.), Perspectives in medical virology, vol. 17. Elsevier, Amsterdam.
181. **Piper-Jenks, N., H. W. Horowitz, and E. Schwartz.** 2000. Risk of hepatitis E infection to travelers. *J Travel Med* **7**:194-9.
182. **Previsani, N., and D. Lavanchy.** 2001. Hepatitis E. World Health Organization.
183. **Pringle, C. R.** 1998. Virus taxonomy--San Diego 1998. *Arch Virol* **143**:1449-59.
184. **Psichogiou, M., E. Vaindirli, E. Tzala, S. Voudiclar, J. Boletis, G. Vosnidis, S. Moutafis, G. Skoutelis, V. Hadjiconstantinou, H. Troonen, and A. Hatzakis.** 1996. Hepatitis E virus (HEV) infection in haemodialysis patients. The Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Nephrol Dial Transplant* **11**:1093-5.
185. **Purdy, M. A., K. A. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, G. R. Reyes, and D. W. Bradley.** 1993. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol* **41**:90-4.
186. **Rehman, S., N. Kapur, H. Durgapal, and S. K. Panda.** 2008. Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology* **370**:77-92.
187. **Renou, C., J. F. Cadranet, M. Bourliere, P. Halfon, D. Ouzan, H. Rifflet, P. Carencio, A. Harafa, J. J. Bertrand, A. Boutrouille, P. Muller, J. P. Igual, A. Decoppet, M. Eloit, and N. Pavio.** 2007. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg Infect Dis* **13**:1094-6.
188. **Renoux, V. M., M. J. Fleury, L. Bousarghin, J. Gaitan, P. Y. Sizaret, A. Touze, and P. Coursaget.** 2008. Induction of antibody response against hepatitis E virus (HEV) with recombinant human papillomavirus pseudoviruses expressing truncated HEV capsid proteins in mice. *Vaccine* **26**:6602-7.
189. **Reyes, G. R., C. C. Huang, A. W. Tam, and M. A. Purdy.** 1993. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol Suppl* **7**:15-25.
190. **Reyes, G. R., M. A. Purdy, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, K. E. Fry, and D. W. Bradley.** 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **247**:1335-9.
191. **Robinson, R. A., W. H. Burgess, S. U. Emerson, R. S. Leibowitz, S. A. Sosnovtseva, S. Tsarev, and R. H. Purcell.** 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* **12**:75-84.
192. **Robson, S. C., S. Adams, N. Brink, B. Woodruff, and D. Bradley.** 1992. Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet* **339**:1424-5.
193. **Rutjes, S. A., W. J. Lodder, M. Bouwknegt, and A. M. de Roda Husman.** 2007. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods* **143**:112-6.
194. **Rutjes, S. A., W. J. Lodder, F. Lodder-Verschoor, H. H. van den Berg, H. Vennema, E. Duizer, M. Koopmans, and A. M. de Roda Husman.** 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* **15**:381-7.
195. **Saad, M. D., H. A. Hussein, M. M. Bashandy, H. H. Kamel, K. C. Earhart, D. J. Fryauff, M. Younan, and A. H. Mohamed.** 2007. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol* **7**:368-73.
196. **Sadler, G. J., G. F. Mells, N. H. Shah, I. M. Chesner, and R. P. Walt.** 2006. UK acquired hepatitis E--An emerging problem? *J Med Virol* **78**:473-5.
197. **Sakano, C., Y. Morita, M. Shiono, Y. Yokota, T. Mokudai, Y. Sato-Motoi, A. Noda, T. Nobusawa, H. Sakaniwa, A. Nagai, H. Kabeya, S. Maruyama, S. Yamamoto, H. Sato, and H. Kimura.** 2009. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* **71**:21-5.
198. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

199. **Schlauder, G. G.** 2004. Hepatitis E: current status, p. 198-222. *In* I. K. Mushahwar (ed.), *Viral Hepatitis. Molecular Biology, Diagnosis, Epidemiology and Control*, vol. 10. Elsevier, Amsterdam.
200. **Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K. Mushahwar.** 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* **57**:243-51.
201. **Schlauder, G. G., B. Frider, S. Sookoian, G. C. Castano, and I. K. Mushahwar.** 2000. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis* **182**:294-7.
202. **Schlauder, G. G., and I. K. Mushahwar.** 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* **65**:282-92.
203. **Schmelz, M., B. Sodeik, M. Ericsson, E. J. Wolffe, H. Shida, G. Hiller, and G. Griffiths.** 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* **68**:130-47.
204. **Schofield, D. J., R. H. Purcell, H. T. Nguyen, and S. U. Emerson.** 2003. Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site at the carboxyterminus of an ORF2 protein vaccine. *Vaccine* **22**:257-67.
205. **Sehgal, D., P. S. Malik, and S. Jameel.** 2003. Purification and diagnostic utility of a recombinant hepatitis E virus capsid protein expressed in insect larvae. *Protein Expr Purif* **27**:27-34.
206. **Seminati, C., E. Mateu, B. Peralta, N. de Deus, and M. Martin.** 2008. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**:130-2.
207. **Shi, X., and D. L. Jarvis.** 2007. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr Drug Targets* **8**:1116-25.
208. **Shrestha, M. P., R. M. Scott, D. M. Joshi, M. P. Mammen, Jr., G. B. Thapa, N. Thapa, K. S. Myint, M. Fournau, R. A. Kuschner, S. K. Shrestha, M. P. David, J. Seriwatana, D. W. Vaughn, A. Safary, T. P. Endy, and B. L. Innis.** 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* **356**:895-903.
209. **Singh, S., A. Mohanty, Y. K. Joshi, D. Deka, S. Mohanty, and S. K. Panda.** 2003. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J Pediatr* **70**:37-9.
210. **Smith, J. L.** 2001. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* **64**:572-86.
211. **Stefanidis, I., E. K. Zervou, C. Rizos, C. Syrganis, E. Patsidis, G. Kyriakopoulos, L. Sdrakas, N. Tsianas, E. I. Rigopoulou, V. Liakopoulos, and G. N. Dalekos.** 2004. Hepatitis E virus antibodies in hemodialysis patients: an epidemiological survey in central Greece. *Int J Artif Organs* **27**:842-7.
212. **Surjit, M., S. Jameel, and S. K. Lal.** 2007. Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **81**:3339-45.
213. **Surjit, M., S. Jameel, and S. K. Lal.** 2004. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol* **78**:320-8.
214. **Sylvan, S. P., S. H. Jacobson, and B. Christenson.** 1998. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among hemodialysis patients in Sweden. *J Med Virol* **54**:38-43.
215. **Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro.** 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* **330**:501-5.
216. **Takahashi, M., S. Kusakai, H. Mizuo, K. Suzuki, K. Fujimura, K. Masuko, Y. Sugai, T. Aikawa, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** 2005. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* **43**:49-56.
217. **Takahashi, M., T. Nishizawa, T. Tanaka, B. Tsatsralt-Od, J. Inoue, and H. Okamoto.** 2005. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* **86**:1807-13.

218. **Takatsuki, A., K. Arima, and G. Tamura.** 1971. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)* **24**:215-23.
219. **Takatsuki, A., and G. Tamura.** 1971. Tunicamycin, a new antibiotic. 3. Reversal of the antiviral activity of tunicamycin by aminosugars and their derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **24**:232-8.
220. **Takatsuki, A., and G. Tamura.** 1971. Tunicamycin, a new antibiotic. II. Some biological properties of the antiviral activity of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)* **24**:224-31.
221. **Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes.** 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**:120-31.
222. **Tamura, A., Y. K. Shimizu, T. Tanaka, K. Kuroda, Y. Arakawa, K. Takahashi, S. Mishiro, K. Shimizu, and M. Moriyama.** 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res* **37**:113-20.
223. **Taremi, M., M. Khoshbaten, L. Gachkar, M. EhsaniArdakani, and M. Zali.** 2005. Hepatitis E virus infection in hemodialysis patients: a seroepidemiological survey in Iran. *BMC Infect Dis* **5**:36.
224. **Tatsis, N., G. Sinnathamby, and L. C. Eisenlohr.** 2004. Vaccinia virus as a tool for immunologic studies. *Methods Mol Biol* **269**:267-88.
225. **Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro.** 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* **362**:371-3.
226. **Ticehurst, J., T. J. Popkin, J. P. Bryan, B. L. Innis, J. F. Duncan, A. Ahmed, M. Iqbal, I. Malik, A. Z. Kapikian, L. J. Legters, and et al.** 1992. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J Med Virol* **36**:84-92.
227. **Tokita, H., H. Harada, Y. Gotanda, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** 2003. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993. *J Gen Virol* **84**:421-7.
228. **Tong, Y., M. Zhan, J. Lu, Y. Bai, and S. Bi.** 2002. [Immunogenicity of recombinant HEV ORF2 protein expressed in pichia pastoris]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **16**:23-6.
229. **Tong, Y. P., S. L. Bi, J. Lu, Y. Z. Jiang, and M. Y. Zhan.** 2003. [Antigenicity identification of recombinant hepatitis E virus ORF2 protein expressed in Pichia pastoris]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **17**:258-61.
230. **Torresi, J., F. Li, S. A. Locarnini, and D. A. Anderson.** 1999. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* **80 (Pt 5)**:1185-8.
231. **Torresi, J., J. Meanger, P. Lambert, F. Li, S. A. Locarnini, and D. A. Anderson.** 1997. High level expression of the capsid protein of hepatitis E virus in diverse eukaryotic cells using the Semliki Forest virus replicon. *J Virol Methods* **69**:81-91.
232. **Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J. L. Gerin, and R. H. Purcell.** 1997. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* **15**:1834-8.
233. **Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J. L. Gerin, and R. H. Purcell.** 1994. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:10198-202.
234. **Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, M. K. Rippy, P. Zack, M. Shapiro, and R. H. Purcell.** 1995. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis* **172**:31-7.
235. **Tyagi, S., H. Korkaya, M. Zafrullah, S. Jameel, and S. K. Lal.** 2002. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem* **277**:22759-67.

236. **Usmanov, R. K., M. S. Balaian, O. V. Dvoynikova, D. B. Alymbaeva, N. A. Zamiatina, A. Kazachkov lu, and V. I. Belov.** 1994. [An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr Virusol* **39**:165-8.
237. **Vaidya, S. R., S. D. Chitambar, and V. A. Arankalle.** 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* **37**:131-6.
238. **van der Poel, W. H., F. Verschoor, R. van der Heide, M. I. Herrera, A. Vivo, M. Kooreman, and A. M. de Roda Husman.** 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* **7**:970-6.
239. **Viswanathan, R., and A. S. Sidhu.** 1957. Infectious hepatitis; clinical findings. *Indian J Med Res* **45**:49-58.
240. **Vitral, C. L., M. A. Pinto, L. L. Lewis-Ximenez, Y. E. Khudyakov, D. R. dos Santos, and A. M. Gaspar.** 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**:117-22.
241. **Wang, C. H., B. Flehmig, and R. Moeckli.** 1993. Transmission of hepatitis E virus by transfusion? *Lancet* **341**:825-6.
242. **Wang, L., and H. Zhuang.** 2004. Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research. *World J Gastroenterol* **10**:2157-62.
243. **Wang, Y., R. Ling, J. C. Erker, H. Zhang, H. Li, S. Desai, I. K. Mushahwar, and T. J. Harrison.** 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* **80** (Pt 1):169-77.
244. **Wang, Y., H. Zhang, Z. Li, W. Gu, H. Lan, W. Hao, R. Ling, H. Li, and T. J. Harrison.** 2001. Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4. *J Clin Microbiol* **39**:4370-9.
245. **Williams, T. P., C. Kasorndorkbua, P. G. Halbur, G. Haqshenas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng.** 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* **39**:3040-6.
246. **Withers, M. R., M. T. Correa, M. Morrow, M. E. Stebbins, J. Seriwatana, W. D. Webster, M. B. Boak, and D. W. Vaughn.** 2002. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* **66**:384-8.
247. **Worm, H. C., G. G. Schlauder, and G. Brandstatter.** 2002. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. *Wien Klin Wochenschr* **114**:663-70.
248. **Worm, H. C., W. H. van der Poel, and G. Brandstatter.** 2002. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect* **4**:657-66.
249. **Worm, H. C., and G. Wirnsberger.** 2004. Hepatitis E vaccines: progress and prospects. *Drugs* **64**:1517-31.
250. **Wu, J. C., C. M. Chen, T. Y. Chiang, I. J. Sheen, J. Y. Chen, W. H. Tsai, Y. H. Huang, and S. D. Lee.** 2000. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol* **60**:166-71.
251. **Yamada, K., M. Takahashi, Y. Hoshino, H. Takahashi, K. Ichiyama, T. Tanaka, and H. Okamoto.** 2009. Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* **90**:457-62.
252. **Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda, and H. Okamoto.** 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* **84**:2351-7.
253. **Yoo, D., P. Willson, Y. Pei, M. A. Hayes, A. Deckert, C. E. Dewey, R. M. Friendship, Y. Yoon, M. Gottschalk, C. Yason, and A. Giuliivi.** 2001. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:1213-9.

254. **Zafrullah, M., M. H. Ozdener, R. Kumar, S. K. Panda, and S. Jameel.** 1999. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* **73**:4074-82.
255. **Zafrullah, M., M. H. Ozdener, S. K. Panda, and S. Jameel.** 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* **71**:9045-53.
256. **Zhang, F., X. Li, Z. Li, T. J. Harrison, H. Chong, S. Qiao, W. Huang, H. Zhang, H. Zhuang, and Y. Wang.** 2006. Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol* **78**:1441-8.
257. **Zhang, H. M., X. Dai, J. H. Meng, Y. Zhao, and X. N. Shan.** 2007. [Characterization of antigenic epitopes of ORF2 encoded proteins of hepatitis E virus genotype 4 identified in China]. *Yi Chuan* **29**:637-42.
258. **Zhang, J., Y. Gu, S. X. Ge, S. W. Li, Z. Q. He, G. Y. Huang, H. Zhuang, M. H. Ng, and N. S. Xia.** 2005. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. *Vaccine* **23**:2881-92.
259. **Zhang, M., S. U. Emerson, H. Nguyen, R. E. Engle, S. Govindarajan, J. L. Gerin, and R. H. Purcell.** 2001. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine* **20**:853-7.
260. **Zhang, M., H. Zhao, and Y. Jiang.** 1999. [Expression of hepatitis E virus structural gene in *E. coli*]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **13**:130-2.
261. **Zhang, W., Q. Shen, J. Mou, G. Gong, Z. Yang, L. Cui, J. Zhu, G. Ju, and X. Hua.** 2008. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health* **55** (6) 291-8.
262. **Zhang, Y., P. McAtee, P. O. Yarbough, A. W. Tam, and T. Fuerst.** 1997. Expression, characterization, and immunoreactivities of a soluble hepatitis E virus putative capsid protein species expressed in insect cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**:423-8.
263. **Zhou, Y. X., M. Y. Lee, J. M. Ng, M. L. Chye, W. K. Yip, S. Y. Zee, and E. Lam.** 2006. A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J Gastroenterol* **12**:306-12.
264. **Zhuang, H., X. Y. Cao, C. B. Liu, and G. M. Wang.** 1991. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* **26 Suppl 3**:135-8.

ANEXO I

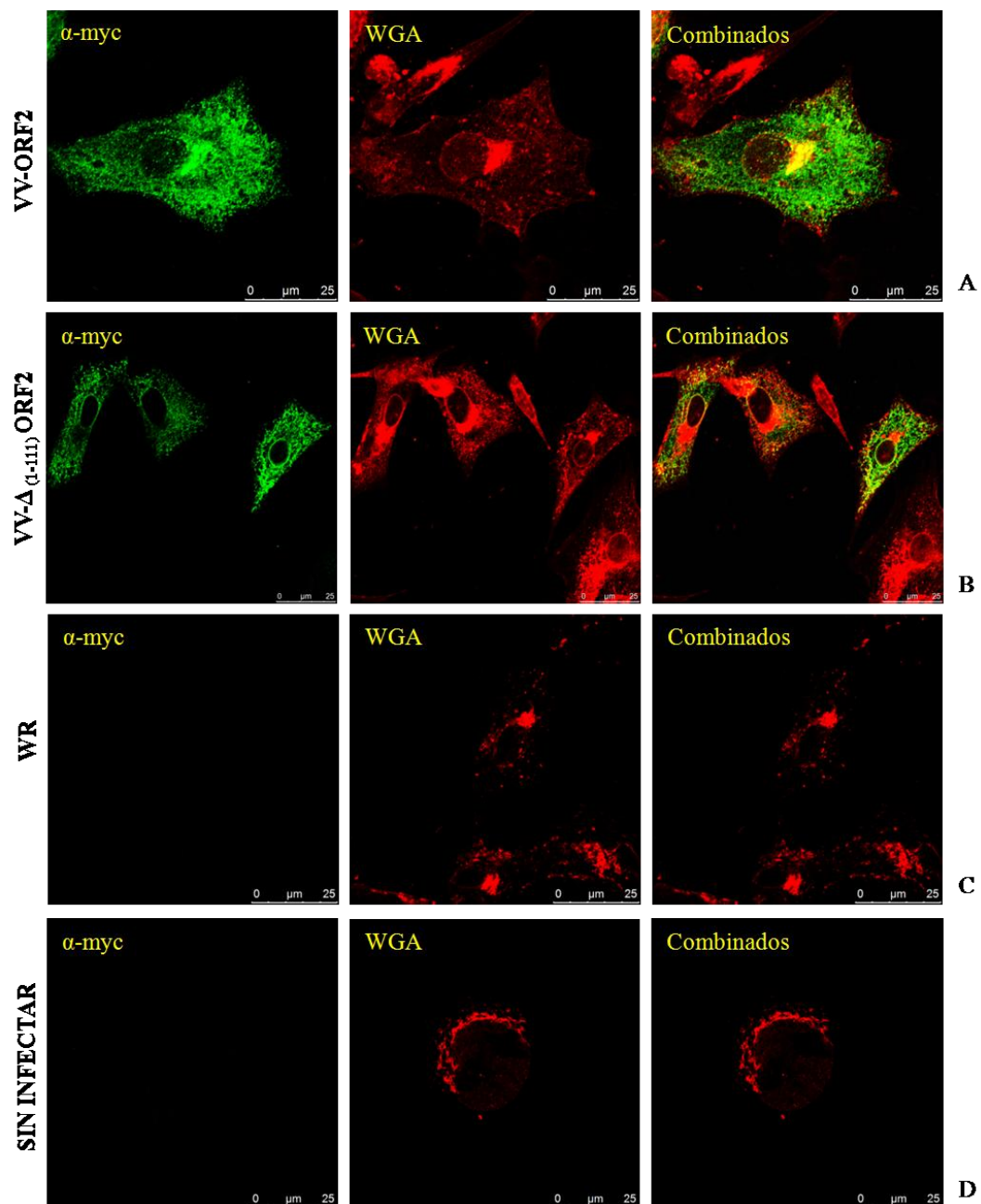


Figura I. Inmunofluorescencia mediante doble marcaje con anti-C-Myc y WGA de células BHK-21 infectadas con los virus vaccinia recombinantes. Las células BHK-21 infectadas (MDI de 1 ufp/célula) con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 (A) y VV- $\Delta_{(1-111)}$ ORF2 (B), virus vaccinia WR (C) o sin infectar (D), se fijaron a las 7 h.p.i. con Metanol absoluto y se incubaron primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C-Myc (a dilución 1:200), seguido de un anticuerpo anti-ratón AlexaFluor-488 (a dilución 1:500) y la lectina WGA conjugada a un fluorocromo Alexa Fluor-594 (a dilución 1:300).

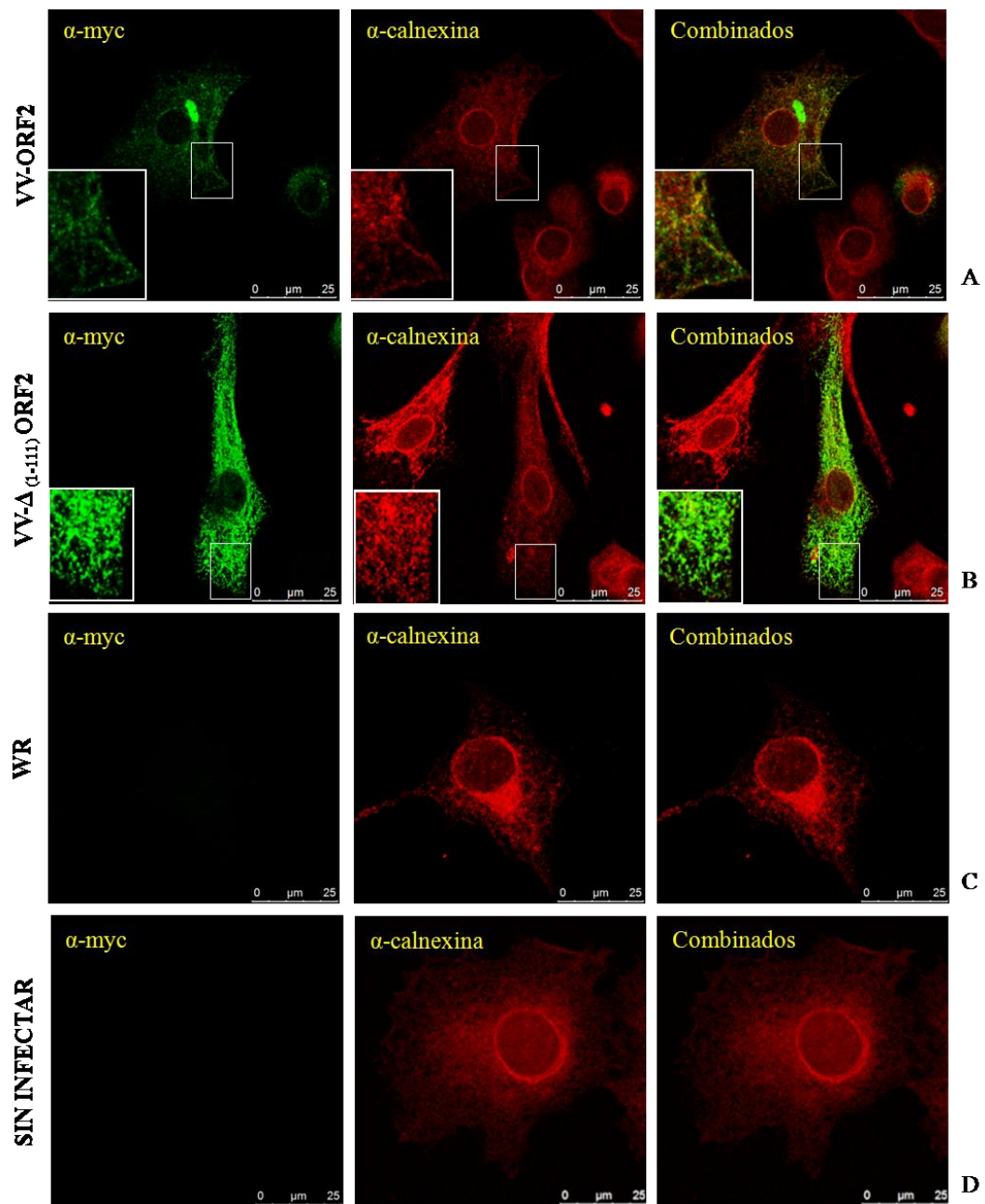


Figura II. Inmunofluorescencia mediante doble marcaje con anti-C-Myc y anti-calnexina, de células BSC-1 infectadas con los virus vaccinia recombinantes. Las células BHK-21 infectadas (MDI de 1 ufp/célula) con los virus vaccinia recombinantes VV-ORF2 (A) y VV- $\Delta(1-111)$ ORF2 (B), virus vaccinia WR (C) o sin infectar (D) se fijaron a las 7 h.p.i. con Metanol absoluto y se incubaron primero con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C-Myc (a dilución 1:200) y un anticuerpo monoclonal de conejo anti-calnexina (a dilución 1:100), seguido de un anticuerpo anti-ratón Alexa Fluor-488 (a dilución 1:500) y un anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor-594 (a dilución 1:400). Los recuadros blancos reflejan zonas de la célula ampliadas para apreciar mejor la colocalización.

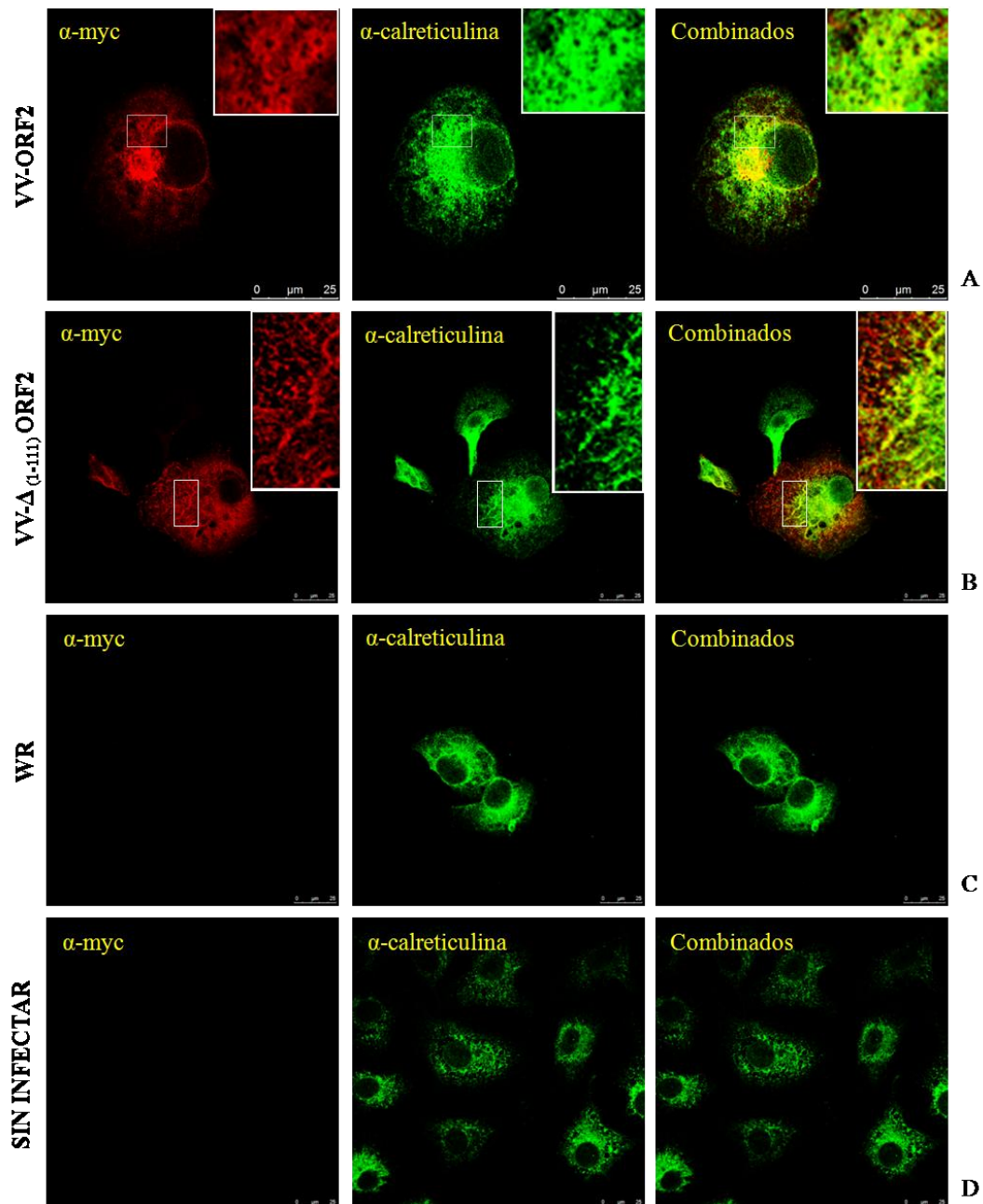


Figura III.: Doble marcaje con anti-C-Myc y anti-calreticulina. Las células BSC-1 infectadas (MDI de 1 ufp/ célula) con los vaccinias recombinantes VV-ORF2 (A), VV-Δ₍₁₋₁₁₁₎ORF2 (B), virus vaccinia WR (C) o sin infectar (D), se fijaron a las 7hpi con Metanol absoluto y se incubaron en primer lugar con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C-Myc (1:200) y un anticuerpo monoclonal de conejo anti-calreticulina (1:300) , seguido de un anticuerpo anti-ratón Alexa-Fluor- 594 (1:400) y un anticuerpo anti-conejo Alexa-Fluor- 488 (1:500). Los recuadros blancos hacen referencia a las zonas de la célula ampliadas para apreciar mejor la colocalización.

